

Материалы

VI Национального конгресса по регенеративной медицине

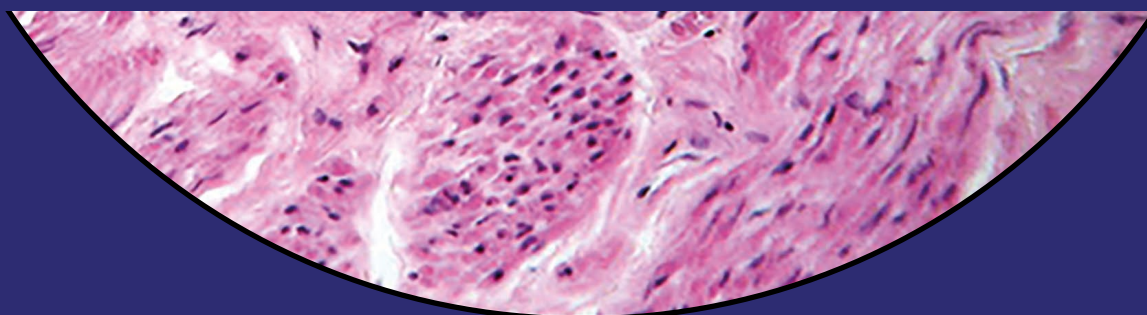
13–15 ноября 2024 года, Санкт-Петербург

МОРФОЛОГИЯ

Proceedings

of the VI National Congress on Regenerative Medicine

November 13–15, 2024, Saint Petersburg



DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>

Организаторы
VI Национального конгресса по регенеративной медицине
Институт цитологии РАН, РОО «Общество регенеративной медицины»,
Санкт-Петербургское отделение Российской академии наук

Рецензенты: *Александрович Н.А., Астрелина Т.А., Баклаушев В.П., Балабаньян В.Ю., Басалова Н.А., Басок Ю.Б., Белоглазова И.Б., Белоусов В.В., Бигильдеев А.Е., Бозо И.Я., Бородкина А.В., Вахрушев И.В., Воротеляк Е.А., Гилевич И.В., Григорьева О.А., Деев Р.В., Дергилев К.В., Енукашвили Н.И., Еремин И.И., Еремичев Р.Ю., Ефименко А.Ю., Животовский Б.Д., Закиян С.М., Захарова И.С., Зубарев И.В., Калабушева Е.П., Калинина Н.И., Карагаюр М.Н., Каралкин П.А., Клубуков И.Д., Климович П.С., Копейна Г.С., Краснов М.С., Кулебякин К.Ю., Лагарькова М.А., Ларин С.С., Лопатина Т.В., Макаревич П.И., Малашичева А.Б., Масчан М.А., Медведев С.П., Михайлова Н.А., Осидак Е.О., Охоботов Д.А., Петинати Н.А., Попов В.С., Попов Д.В., Потанина О.Г., Севастьянов В.И., Семина Е.В., Сергеева Н.С., Силачев Д.Н., Стамбольский Д.В., Стафеев Ю.С., Сысоева В.Ю., Томилин А.Н., Тюрин-Кузьмин П.А., Хотин М.Г., Степанова О.В., Павлова Г.В.*

Программный комитет

Председатель программного комитета:

Ткачук Всеволод Арсеньевич, РОО «Общество регенеративной медицины», и.о. директора МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Члены программного комитета:

Белоусов Всеволод Вадимович, Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва

Буравкова Людмила Борисовна, Институт медико-биологических проблем РАН, Москва

Воронцова Мария Владимировна, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Воротеляк Екатерина Андреевна, Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва

Галагудза Михаил Михайлович, Институт экспериментальной медицины НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

Деев Роман Вадимович, НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына, Москва

Дризе Нина Иосифовна, Гематологический научный центр Минздрава России, Москва

Ефименко Анастасия Юрьевна, Центр регенеративной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Животовский Борис Давидович, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва; Karolinska Institutet, Стокгольм

Закиян Сурен Минасович, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Киясов Андрей Павлович, Институт фундаментальной медицины Казанского федерального университета, Казань

Кудлай Дмитрий Анатольевич, АО «Генериум», Владимирская обл.

Лагарькова Мария Андреевна, ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Малашичева Анна Борисовна, Институт цитологии РАН, НМИЦ им. В.А. Алмазова Минздрава России, Санкт-Петербург

Павлова Галина Валериевна, Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва

Парфенова Елена Викторовна, НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва

Рубина Ксения Андреевна, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Севастьянов Виктор Иванович, АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва

Томилин Алексей Николаевич, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Ярыгин Константин Никитич, НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва

Секретарь программного комитета:

Тарасова Елена Владимировна, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине [электронный ресурс]; Санкт-Петербург, М34 13–15 ноября 2024 г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2024. 1157 с. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>

ISBN 978-5-907886-06-3

В сборнике опубликованы мини-статьи научных работ, представленных на VI Национальном конгрессе по регенеративной медицине, который прошел в Санкт-Петербурге 13–15 ноября 2024 года.

Регенеративная медицина — это совершенно новое направление медицины, которое стало появляться в конце прошлого века и сейчас стремительно развивается. Здоровье, гармония, благополучие — это когда два процесса, гибель и образование клеток в организме, сбалансированы. Только в последние десятилетия мы стали понимать, как запускаются процессы гибели клеток. Открылись также новые возможности регулировать образование новых клеток. Важную роль в этих процессах играют стволовые клетки — их научились выделять из разных тканей, выращивать, приумножать и возвращать обратно. В последние десятилетия выяснилось, что в организме одни зрелые клетки могут превращаться в другие. Понемногу мы стали понимать роль регуляторных РНК, которые записаны на нетранскрибируемой части ДНК, и появилась новая возможность регулировать процессы репарации, регенерации, обновления клеток в теле человека. Есть перспектива появления новой терапии, которая будет направлена не только на регуляцию живых клеток, но и на выращивание новых клеток, тканей, структур в нашем организме.

Ключевые слова: регенеративная медицина; биомедицина; генная терапия; клеточная терапия; механизмы регенерации; стволовая клетка; ниша стволовой клетки; дифференцировка клеток; физиологические механизмы регенерации; регуляция процессов регенерации и репарации; банки клеток; редактирование генома; клеточная гибель; продукты для регенеративной медицины; биоматериалы; модели для доклинических исследований; трансляционные исследования в регенеративной медицине.

УДК 612.6+575
ББК 28.03+28.04+28.05

Для цитирования: Материалы VI Национального конгресса по регенеративной медицине [электронный ресурс]; Санкт-Петербург, 13–15 ноября 2024 г. Санкт-Петербург: Эко-Вектор, 2024. 1157 с. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>

Издано при поддержке федерального государственного бюджетного учреждения «Санкт-Петербургское отделение Российской академии наук»

Оригинал-макет изготовлен ООО «Эко-Вектор»
Адрес: 191181, Санкт-Петербург, Аптекарский пер., д. 3, лит. А, пом. 1Н
E-mail: info@eco-vector.com, WEB: <https://eco-vector.com>

Научные редакторы В.А. Ткачук, А.Н. Томилин
Корректор И.В. Смирнова
Верстка А.Г. Хуторовская

Формат 60×90/8. Усл.-печ. л. 144,6.
Гарнитура Eco-Vectord Cond
Подписано 08.11.2024

Organizers of the VI National Congress on Regenerative Medicine

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences,
Society for regenerative medicine, Saint Petersburg Branch of the Russian Academy of Sciences

Reviewers: *Aleksandrushkina N.A., Astrelina T.A., Baklaushev V.P., Balabanyan V.Yu., Basalova N.A., Basok Yu.B., Beloglazova I.B., Belousov V.V., Bigildeev A. E.E., Bozo I.Ya., Borodkina A.V., Vakhrushev I.V., Vorotelak E.A., Gilevich I.V., Grigorieva O.A., Deev R.V., Dergilev K.V., Erukashvili N.I., Eremin I.I., Eremichev R.Yu., Efimenko A.Yu., Zhivotovsky B.D., Zakiyan S.M., Zakharova I.S., Zubarev I.V., Kalabusheva E.P., Kalinina N.I., Karagyaur M.N., Karalkin P.A., Klabukov I.D., Klimovich P.S., Kopeina G.S., Krasnov M.S., Kulebyakin K.Yu., Lagarkova M.A., Larin S.S., Lopatina T. V., Makarevich P.I., Malashicheva A.B., Maschan M.A., Medvedev S.P., Mikhailova N.A., Osidak E.O., Okhobotov D.A., Petinati N.A., Popov V.S., Popov D.V., Potanina O.G., Sevastyanov V.I., Semina E.V., Sergeeva N.S., Silachev D.N., Stambolsky D.V., Stafeev Yu.S., Sysoeva V.Yu., Tomilin A.N., Tyurin-Kuzmin P.A., Khotin M.G., Stepanova O.V., Pavlova G.V.*

Program Committee

Chairman of the program committee:

Vsevolod A. Tkachuk, Society for regenerative medicine, Lomonosov State University, Moscow

Program Committee Members:

Vsevolod V. Belousov, Federal Center for Brain and Neurotechnology FMBA of Russia, Moscow

Lyudmila B. Buravkova, Institute of biomedical problems, Russian Academy of Sciences, Moscow

Maria V. Vorontsova, Lomonosov State University, Moscow

Ekaterina A. Vorotelak, Koltsov Institute of developmental biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Mikhail M. Galagudza, Institute of Experimental Medicine Almazov National Medical Research, Saint Petersburg

Roman V. Deev, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Moscow

Nina I. Drize, Hematological Research Center, Moscow

Anastasia Yu. Efimenko, Center of regenerative medicine, Lomonosov State University, Moscow

Boris D. Zhivotovsky, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Karolinska Institutet, Stockholm

Suren M. Zakian, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Andrey P. Kiyasov, Kazan Federal University, Kazan

Dmitry A. Kudlay, Generium Pharmaceuticals, Vladimir Region

Maria A. Lagarkova, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of FMBA, Moscow

Anna B. Malashicheva, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences; Almazov National Medical Research, Saint Petersburg

Galina V. Pavlova, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Yelena V. Parfyonova, Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow

Ksenia A. Rubina, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Viktor I. Sevastianov, Institute of Medical and Biological Research and Technology, Moscow

Alexey N. Tomilin, Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg

Konstantin N. Yarygin, Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

Secretary of the Program Committee:

Elena V. Tarasova, Secretary of the Programm Committee, Lomonosov Moscow State University, Moscow

Proceedings of the VI National Congress on Regenerative Medicine [Internet]; Saint Petersburg, November 13–15, 2024. Saint Petersburg: Eco-Vector; 2024. 1157 p. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>

ISBN 978-5-907886-06-3

This issue contains mini-articles of scientific works, presented at the VI National Congress on Regenerative Medicine, which was held in Saint Petersburg, Russia on November 13–15, 2024.

Regenerative medicine is a completely new field of medicine, that began to appear at the end of the last century and is now rapidly developing. Only in recent decades have we begun to understand how cell death processes are triggered. New opportunities have also opened up to regulate the formation of new cells. Stem cells play an important role in these processes — they have learned to isolate them from different tissues, grow them, multiply them and return them back. In recent decades, it has become clear that in the body some mature cells can turn into others. Little by little, we began to understand the role of regulatory RNAs that are written on the non-transcribed part of DNA, and a new opportunity appeared to regulate the processes of repair, regeneration, and cell renewal in the human body. There is a prospect of a new therapy that will be aimed not only at regulating living cells, but also at growing new cells, tissues, and structures in our body.

Keywords: regenerative medicine; biomedicine; gene therapy; cell therapy; regeneration mechanisms; stem cell; stem cell niche; cell differentiation; physiological mechanisms of regeneration; regulation of regeneration and repair processes; cell banks; genome editing; cell death; products for regenerative medicine; biomaterials; models for preclinical research; translational research in regenerative medicine.

For citation: Proceedings of the VI National Congress on Regenerative Medicine [Internet]; Saint Petersburg, November 13–15, 2024. Saint Petersburg: Eco-Vector; 2024. 1157 p. DOI: <https://doi.org/10.17816/morph.konf2024>

Published with the support of the St. Petersburg Branch of the Russian Academy of Sciences

Содержание

<i>Абакушина Е.В., Степанова И.А., Румянцев С.А.</i> Оценка противоопухолевой активности НК-клеток на модели <i>in vivo</i>	31
<i>Абдрахманова И.И., Городилова А.В., Филин И.Ю., Чернов В.М., Соловьева В.В., Ризванов А.А.</i> Анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток вартонового студня, экспрессирующих апоптоз-индуцирующий лиганд TRAIL	33
<i>Абдулкадиева М.М., Слонова Д.А., Антонова Н.П., Собянин К.А., Литвиненко В.В., Паршина О.В., Гусева Т.С., Васина Д.В., Сысолятина Е.В.</i> Разработка мышиной модели инфицированных <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ран для оценки антибактериального и ранозаживляющего эффектов эндолизина LysAm24-SMAP	35
<i>Агарёва М.Ю., Стафеев Ю.С., Мичурина С.С., Шестакова Е.А., Томилова А.О., Синеокая М.С., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В., Шестакова М.В.</i> Бариатрическая операция способствует усилению термогенной активности белых и бежевых адипоцитов	37
<i>Агеева Т.В., Плотникова Е.А., Давлетшин Э.Ф., Шигапова Р.Р., Мухамедшина Я.О.</i> Разработка подхода биолюминисцентной оптогенетической стимуляции спинальных мотонейронов поясничного отдела травмированного спинного мозга	39
<i>Адешелидзе С.Р., Гетманова Т.Е., Диденко Н.Н., Гатило Ю.Ю.</i> Новые подходы к улучшению регенерации нервной ткани: применение секретома NCSCs	41
<i>Азаркина К.Е., Божокин М.С., Переплетчикова Д.А., Малашичева А.Б.</i> Влияние сигнального пути Notch на хондрогенную дифференцировку человеческих остеообластов	43
<i>Александр-Синклер Э.И., Журенков К.Э., Блинова М.И.</i> Клеточные технологии в регенеративных стратегиях реэпителизации рогаговыцы	45
<i>Александрова А.Д., Гайдамака А.О., Воротеляк Е.А.</i> Роль сигнального пути Notch в функциональной активности CD90 ⁺ прогениторной клеточной популяции стромы эндометрия матки мыши	47
<i>Александрова Е.В., Ермакова В.В., Кузьмин А.А., Томилин А.Н.</i> Создание модели изучения цис-регуляторной активности промотора Pou5f1 в дифференцированных клетках мыши	49
<i>Александрова С.А., Давыденко Б.Н., Дарвиш Д.М., Титова А.Р.</i> Математическое моделирование и визуализация при исследовании биоматериалов	51
<i>Александрович Н.А., Нимирицкий П.П., Глазьева В.С., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И.</i> Клеточные пласты из МСК: прогресс в биоинженерии тканей, управлении процессами регенерации и ангиогенезом	53
<i>Алексеев А.А., Филимонов К.А., Бобровников А.Э., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Хромина С.С., Сучкова Ю.Б.</i> Влияние аутологичных клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ ЖТ) на регенерацию сетчатых кожных трансплантатов у больных с обширными ожогами	55
<i>Алексеева Н.А., Бойко А.А., Коваленко Е.И.</i> Повышенный цитотоксический потенциал CX3CR1 ⁺ НК-клеток в отношении опухолевых сфероидов реализуется даже при низком уровне экспрессии CX3CL1	57
<i>Алексеев Л.Л., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.</i> Динамика экспрессии генов комплексного ответа на стресс мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека, переживших тепловой шок	59
<i>Анацкая О.В., Пономарцев С.В., Елмуратов А.У., Харченко М.В., Корнилова Е.С., Виноградов А.Е.</i> Повреждение ДНК, избыточная полиплоидия и признаки ускоренного старения кардиомиоцитов взрослых крыс после перинатальной непереносимости лактозы	61
<i>Анохин Е.В., Седуш Н.Г., Королев С.В., Чвалун С.Н.</i> Синтез и исследование поли(L-лактид-ко-ε-капролактона) для создания биоразлагаемого мочеточникового стента	63
<i>Антипина М.И., Ли В.А., Семина Е.В.</i> Создание и оценка генетических векторов и клеточных <i>in vitro</i> моделей болезни Альцгеймера для решения исследовательских и прикладных задач	65
<i>Антонова Л.В.</i> Особенности преclinical испытаний тканеинженерных сосудистых протезов с биодеградируемой составляющей: от крыс до приматов	67
<i>Антропова И.П., Александрова А.Д., Волокитина Е.А., Кутелов С.М.</i> Влияние блокирования P2Y ₁₂ рецепторов тромбоцитов на регенерацию	69

<i>Арзуманянц Е.В., Перова Н.В., Севастьянов В.И.</i>	
Отрицательные показатели санитарно-химических исследований медицинских изделий и биоматериалов при положительных результатах биологических испытаний: артефакт или руководство к действию	71
<i>Арссан М.А., Шевченко А.И., Захарова И.С.</i>	
На пути к совершенству: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека и возможность воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы	73
<i>Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Михадаркина О.Г., Маливанова Т.Ф., Самойлов А.С.</i>	
Биомедицинские технологии при лечении местных радиационных поражений	75
<i>Атаманова А.А., Седуш Н.Г., Королев В.В., Чвалун С.Н.</i>	
Биоразлагаемые полимеры на основе лактида, гликолида и ε-капролактона для регенеративной медицины	77
<i>Бабарико Д.В., Даниленко О.В., Шингель А.М., Сяхович В.Э., Бакакина Ю.С., Походня Ю.Г.</i>	
Получение сфероидов <i>in vitro</i> на основе клеток печени человека с использованием ротационного биореактора с целью изучения метаболизма андрогенных анаболических стероидов	79
<i>Базанович С.А., Звягинцева М.А., Морозова Я.В., Радаев С.М., Смирнов В.А., Гринь А.А., Рябов С.И.</i>	
Эффективность клеточной терапии криоконсервированными клетками пуповинной крови человека спинальной травмы: от эксперимента к клинике	81
<i>Базылева К.Ю., Шарикова Н.А., Малахов С.Н., Григорьев Т.Е.</i>	
Влияние условий кристаллизации полимерных растворов на структуру и свойства аэрогелей	83
<i>Базылева К.Ю., Малахов С.Н., Шариков Р.В., Григорьев Т.Е.</i>	
Исследование влияния скорости заморозки на структуру и свойства губчатых материалов на основе поливинилового спирта	86
<i>Баклаушев В.П.</i>	
Нейрорегенеративная терапия спинальной травмы: протезировать нельзя восстановить?	88
<i>Бакуменко С.С., Джабраилов В.Д., Сергеева Т.О., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И., Богомолов П.О.</i>	
Исследование функциональности гепатоцитов на примере концентрации альбумина с использованием спектрофотометрического анализа	90
<i>Баранова Н.В., Величко В.В., Пономарева А.С., Қирсанова Л.А., Басок Ю.Б., Севастьянов В.И.</i>	
Разработка и исследование биомиметика внеклеточного матрикса на основе децеллюляризованной селезенки крысы	92
<i>Барановский Д.С., Клабуков И.Д., Колобаев И.В., Усачев В.С., Афонин Г.В., Усачева А.Ю., Шкляев С.С., Иванов С.А., Шегай П.В., Каприн А.Д.</i>	
Клинический опыт двухэтапной персонализации в реконструктивной хирургии: первое в мире применение индивидуально изготовленного титанового эндопротеза в комбинации с локальными инъекциями минимально манипулированных клеток	94
<i>Баркалова М.К., Воробьев А.Н., Ненахова-Гельфанд М.В., Абрамович Р.А., Потанина О.Г.</i>	
Антипролиферативная активность пеллет дигидрохверцетина	96
<i>Басалова Н.А., Виговский М.А., Попов В.С., Григорьева О.А., Лагерева Е.А., Ефименко А.Ю.</i>	
Роль активированных стромальных клеток в прогрессии и реверсии фиброза	98
<i>Басина В.П., Бухарова Т.Б., Недарубова И.А., Черномырдина В.О., Меглей А.Ю., Миронов А.В., Васильев А.В., Попов В.К., Гольдштейн Д.В., Кулаков А.А.</i>	
Разработка протокола получения ген-активированных остеопластических материалов с помощью трехмерной печати	100
<i>Басович Л.С., Переплетчикова Д.А., Карелкин В.В., Малашичева А.Б.</i>	
Регулирование остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток путем модификации уровня экспрессии компонентов сигнального пути Notch	102
<i>Бахмет Е.И.4</i>	
Роль белков Pcbp1 и Napog в самообновлении и дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток	104
<i>Бахчинян Е., Зиновьева А.А., Волошин Н.С., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А., Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю.</i>	
Изменения в ПТГ-зависимых сигнальных каскадах в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при старении	106
<i>Башарова К.С., Безрукова А.И., Григорьева Е.В., Копытова А.Э., Байдакова Г.В., Павлова С.В., Милюхина И.В., Медведев С.П., Захарова Е.Ю., Пчелина С.Н., Усенко Т.С.</i>	
Сопоставление эффективности препаратов, направленных на восстановление активности глюкоцереброзидазы, при болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене <i>GBA1</i> , на пациент-специфичных клетках	108
<i>Безрукова А.И., Башарова К.С., Милюхина И.В., Пчелина С.Н., Усенко Т.С.</i>	
Первичная культура макрофагов периферической крови как модель для изучения процессов аутофагии и разработки таргетной терапии для идиопатической и моногенной форм болезни Паркинсона	110

<i>Бекетова М.В., Балышева К.Д., Журиков Р.В., Румянцев С.А., Абакушина Е.В.</i> Изучение влияния различных антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих мембран связанный IL15 или IL21, на пролиферацию и активацию клеток натуральных киллеров человека	113
<i>Белик Л.А., Остромышенский Д.И., Семенова Н.Ю., Бессмельцев С.С., Сидоркевич С.В., Мартынкевич И.С., Енукашвили Н.И.</i> Экспрессия лигандов WNT в костном мозге пациентов с множественной миеломой	115
<i>Белова А.Д., Гусева Е.А., Немец Е.А., Пономарева А.С., Григорьев А.М., Тюрина С.А., Басок Ю.Б., Севастьянов В.И.</i> Получение пористого каркаса на основе продуктов ферментативной деградации децеллюляризованного хряща	117
<i>Белова Ю.И., Зубарева Т.С., Панфилова А.С., Федорина А.И., Кветной И.М.</i> Функциональная роль митохондрий в регенерации тканей: механизмы действия и перспективы применения	119
<i>Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Дергулев К.В., Гольцева Ю.Д., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В.</i> Трансформация эндотелиальных клеток из ангиогенного фенотипа «трубочки» в неактивный «островки» в 2D-модели сокультивирования <i>in vitro</i> : VEGF, эфрины, Notch	121
<i>Белый С.А.</i> Интракoronарное введение аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга как отдельный вид лечения пациентов с заболеваниями сердца: практический опыт 20 лет работы	123
<i>Белый С.А.</i> Восстановление сердца у больных дилатационной кардиомиопатией после повторных циклов интракoronарного введения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга	125
<i>Беляева А.А., Перепелина К.И., Кузнецова Е.А., Смирнова Д.В., Костарева А.А., Васичкина Е.С., Переплетчикова Д.А., Малашичева А.Б.</i> Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от пациента с синдромом Синглтона–Мертена, как платформа для создания модели изучения патологической кальцификации	127
<i>Бернарделли Л.И., Емелин А.М., Индейкин Ф.А., Деев Р.В.</i> Регенерация клеток эпителия при воспалительных заболеваниях кишечника	129
<i>Бескина В.Э., Околитенко М.С., Горбулич А.В.</i> Гистопография тучных клеток в тканях кожи после однократного воздействия рентгеновского облучения	131
<i>Бигильдеев А.Е., Булыгина Е.С., Цыганкова С.В., Илларионова О.И., Лядова И.В.</i> Предварительное повреждение стромы костного мозга у мышей способствует приживлению донорских стромальных клеток-предшественниц после их внутривенного введения	133
<i>Бикмулина П.Ю.</i> Биофабрикация биоэквивалентов на основе МСК с использованием 3D-биопечати и фотобиомодуляции	135
<i>Билалова А.Р., Кабдеш И.М., Тутова О.Н., Мухамедшина Я.О., Чельшев Ю.А.</i> Посттравматические реакции нейронов передних рогов спинного мозга крысы в поясничном отделе, отдалённом от эпицентра травмы	137
<i>Билялов А.И., Козлова О.С., Филатов Н.С., Шагмарданова Е.И., Киясов А.П., Гусев О.А.</i> Транскриптомика единичных клеток эластического хряща ушной раковины мыши рода <i>Acomys</i>	139
<i>Бирюкова В.Н., Басалова Н.А., Виговский М.А., Григорьева О.А., Монакова А.О., Макаревич П.И., Ефименко А.Ю.</i> Подбор среды роста для сохранения свойств МСК в условиях длительного культивирования и производства биологических препаратов на основе их секретомы	141
<i>Богданова Д.Н., Чабина А.С., Нащекин А.В., Нащекина Ю.А.</i> Влияние полиэтиленгликоля в составе пленок на основе поликапролактона на адгезию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток	143
<i>Богомазова А.Н., Секретова Е.К., Федоренко А.В., Хомякова Е.А., Сурдина А.В., Лиманская Т.В., Лебедев И.Н., Лагарькова М.А.</i> Нарушение сигнального пути Rho-ROCK и миграции нейронов в ИПСК-модели X-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто	145
<i>Богомолова А.Ю., Ермакова П.С., Васильчикова Е.А., Целоусова Ю.М., Загайнова Е.В., Кашина А.В.</i> <i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> оценка биобезопасности децеллюляризованных матриц, используемых для создания микроокружения инсулин-продуцирующих клеток	147
<i>Богоякова М.Е., Секретова Е.К., Ануфриева К.С., Казакова А.Н., Григорьева Т.Н., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А.</i> «Огонь по своим»: незрелость клеток как возможная причина нарушения толерантности иммунной системы в отношении аутологичных производных ИПСК	150
<i>Божокин М.С., Корнева Ю.С., Божкова С.А., Сопова Ю.В., Нащекина Ю.А., Хотин М.Г.</i> Использование аллогенных фибробластов для тканевой инженерии гиалинового хряща в эксперименте	152

<i>Балдырева М.А., Трубкина Е.И., Азарёва М.Ю., Мичурина С.С., Стафеев Ю.С., Парфёнова Е.В.</i>	
Сравнительный анализ морфофизиологических особенностей жировой ткани иглистых мышей <i>Acotmys sp.</i> относительно классической модели <i>Mus Musculus</i>	154
<i>Балтовская В.В., Кулагина Л.Н., Старикова Т.В., Нефедова И.Ф., Мякотных М.Н., Миронов А.А.</i>	
Способ получения гемопоэтических и мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга человека	156
<i>Бондаренко Н.А., Суровцева М.А., Ким И.И., Остапец С.В., Косарева О.С., Дровосеков М.Н., Повещенко О.В.</i>	
Мезенхимальные стволовые клетки из жировых тел Биша для регенерации костной ткани	158
<i>Боровикова С.Е., Круглова Н.А., Тюкачева Е.А., Лужин А.В., Ульянов С.В., Мазуров Д.В., Шепелев М.В.</i>	
Конструирование и оптимизация библиотеки GPI-заякоренных пептидов для скрининга в вирусологических тестах	160
<i>Боярская Н.В., Скорцану О.И., Успенский В.Е., Щербинин Т.С., Филиппов А.А., Пищугин А.С., Галаятдинов И.В., Малашичева А.Б.</i>	
Влияние пиностробина и его производных на патологическую кальцификацию аортального клапана	162
<i>Брюховецкий А.С., Долгополов И.С.</i>	
Персонализированная медицина нового поколения: генно-ориентированная и протеом-основанная ультрааная молекулярная диагностика и эпигенетическая CNIP-фокусированная терапия неинфекционных болезней цивилизации	164
<i>Букатин А.С., Плешаков П.С., Тюшкевич А.А., Белоусова Д.А., Филатов Н.А.</i>	
Микрофлюидная платформа для высокопроизводительного синтеза клеточных сфероидов для регенеративной медицины и 3D-биопечати	166
<i>Булычева Ю.И., Астрелина Т.А., Маливанова Т.Ф., Кобзева И.В., Никитина В.А., Сучкова Ю.Б., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Михадаркина О.Г., Цимахович А.О., Серова О.Ф., Самойлов А.С.</i>	
STR-анализ мезенхимальных стромальных клеток комплекса плацентарной ткани	168
<i>Бурка И.С., Маланин Д.А., Демещенко М.В., Кондрашенко В.В., Ласков И.Г.</i>	
Возможности внутрисуставной терапии обогащенной тромбоцитами плазмой при лечении пациентов с терминальной стадией остеоартрита коленного сустава	170
<i>Бурьянская Е.Л., Градов О.В., Градова М.А., Маклакова И.А.</i>	
Мультифрактальные характеристики потенциальных скаффолдов: взгляд с позиций регенеративной медицины	172
<i>Бутузова Д.А., Кулебякина М.А., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.</i>	
Идентификация белковых партнеров и субстратов ферментативной активности белка FAPA в активированных фибробластах методом протеомного анализа	174
<i>Вавилова Ю.Д., Величинский Р.А., Юсубалиева Г.М., Стрельцова М.А., Коваленко Е.И.</i>	
Получение CAR-UCB-NK-клеток, направленных на простатспецифический мембранный антиген PSCA	176
<i>Виговский М.А., Басалова Н.А., Дьячкова У.Д., Попов В.С., Толстолужинская А.Е., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю.</i>	
Роль клеточного старения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в развитии фиброза	178
<i>Власова И.И., Ефремов Ю.М., Сулейманов Ш.К., Урмантаева Н.Т., Якимов Б.П., Ширшин Е.А., Тимашев П.С.</i>	
Редокс-регуляция взаимодействия скаффолдов с фагоцитами в процессе регенерации ткани	180
<i>Власова Т.И., Бродовская Е.П., Мадонов К.С., Хуторская И.А., Лошкарева А.И.</i>	
Оптимизация протокола для изучения влияния обогащённой тромбоцитами плазмы на культуру дермальных фибробластов	182
<i>Водякова М.А., Покровский Н.С., Мельникова Е.В.</i>	
Аспекты применения проточной цитометрии в оценке качества CAR-T препаратов	184
<i>Волик П.И., Замараев А.В., Егоршина А.Ю., Первушин Н.В., Капуста А.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Липатова А.В., Кане Т., Лаврик И.Н., Животовский Б.Д., Копина Г.С.</i>	
Роль белка р62 в регуляции активации каспазы-2	186
<i>Волкова М.В., Ковалевский Я.Б., Еремин П.С., Марков П.А.</i>	
Влияние модификации хитозана аскорбиновой, гликолиевой и молочной кислотами на цитосовместимость с клетками человека	188
<i>Воловиков Е.А., Смирнова А.С., Богомазова А.Н.</i>	
Клеточная модель для изучения роли GNAO1 в нейрогенезе	190
<i>Волов Н.В., Григорьева Ю.В.</i>	
К вопросу об остеогенном регенераторном потенциале слизисто-надкостничной выстилки верхнечелюстной пазухи у мужчин второго периода зрелости	192

Волошин С.Ю., Усанова А.П., Логинова Н.П., Анискин Д.А., Аксенова Н.А., Романцова О.М., Красавин М.Ю., Уласов И.В., Антошин А.А., Тимашев П.С.

Лактоферриновые частицы потенцируют противоопухолевое действие ингибитора карбоангидразы II в отношении клеточной линии саркомы Юинга. 194

Воронкина И.В., Смагина Л.В., Островская А.А., Мальцева С.В., Пигаревский П.В., Лукин С.В., Тянянский Д.А.

Активность ММП и содержание некоторых компонентов внеклеточного матрикса в тканях каротидных артерий человека при атеросклерозе 196

Высоких М.Ю., Аверина О.А., Адрианов М.А., Вигровский М.А., Филиппов В.В., Бородай Я.Р., Марей М.В., Григорьева О.А., Вепхвадзе Т.Ф., Курочкина Н.С., Манухова Л.А., Ефименко А.Ю., Попов Д.В., Скулачев В.П.

Возраст-зависимый контроль продукции митохондриальных активных форм кислорода при сопряжении креатинкиназной реакции и окислительного фосфорилирования в скелетной мышце долго- и короткоживущих видов. 198

Гайдамака А.О., Александрова А.Д., Румянцева С.М., Воротеляк Е.А.

Гормональная регуляция YAP/TAZ сигналинга в CD90⁺ прогениторной популяции стромы эндометрия мыши 200

Ганцова Е.А., Вишнякова П.А., Карягина В.Е., Мамедов А.Т., Ельчанинов А.В.

Динамика миграции популяции лейкоцитов при регенерации на мышинной модели резекции печени с предварительной спленэктомией. 202

Гетманова Т.Е., Адешелидзе С.Р., Диденко Н.Н., Гатило Ю.Ю.

Применение биомедицинских клеточных продуктов для торможения пролиферации клеток меланомы человека *in vitro* 204

Гилевич И.В., Поляков И.С., Порханов В.А., Коваленко А.Л., Орлов С.В., Карал-Оглы Д.Д.

Экспериментальное обоснование способа клеточной терапии в торакальной хирургии. 206

Гилевич И.В., Ираклинова Н.С., Коломийцева Е.А., Глазков И.С., Толмачева Ю.И., Зозуля Л.В.

Оптимизация условий культивирования дермальных фибробластов с целью создания биобанка аллогенных фибробластов. 208

Гилязова А.Н., Усанова А.П., Волошин С.Ю., Истранова Е.В., Тимашев П.С., Антошин А.А.

Оптически прозрачные коллагеновые мембраны, полученные методом электрофоретического осаждения, для применения в офтальмологии. 210

Гладких Д.А., Дроздова М.Г., Толстова Т.В., Сажнев Н.А., Усвалиев А.Д., Веселов М.М., Кильдеева Н.Р., Клячко Н.Л., Марквичева Е.А.

Композитные хитозан/фиброиновые матриксы, содержащие магнитные наночастицы, для тканевой инженерии 212

Говорова И.А., Новикова Ю.А., Никиточкина С.Ю., Сулягина О.И., Воротеляк Е.А.

Фармакологическая активация HIPPO/YAP сигналинга способствует дифференцировке альвеолярного эпителия и сокращению доли PDGFR α мезенхимы легких 214

Головнева Е.С., Тахавиев Р.В., Брюхин Г.В.

Модуляция регенеративного ответа мышечной ткани лазерным воздействием зеленого и инфракрасного спектра 216

Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко А.С., Еремеев А.В.

Изучение специфической фармакологической активности препарата тканевой инженерии для лечения повреждений хрящевой ткани на кроликах 218

Голубцова Н.Н., Прокопьева Т.Н., Гунин А.Г.

Участие mTOR-сигнализации в регуляции регенерации дермы человека с возрастом 220

Голубчиков Д.О., Евдокимов П.В., Путляев В.И.

Биорезорбируемые остеокондуктивные композиты, наполненные аморфным фосфатом кальция для восстановления костной ткани 222

Гольдберг М.А., Смирнов С.В., Оболкина Т.О., Сафонов С.О., Мосолов А.Н., Котельников Н.Л., Волков А.В., Ахмедова С.А., Кирсанова В.А., Свиридова И.К., Сергеева Н.С., Комлев В.С.

Изготовление персонализированных имплантатов из оксидной керамики с помощью аддитивного производства методом цифровой светодиодной проекции. 224

Гольцева Ю.Д., Ярушкина И.С., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Ратнер Е.И., Азимова Е.Л., Гуреевков А.Д., Парфенова Е.В., Дергилев К.В.

Сравнение свойств сфероидов (кардиосфер), полученных двумя разными способами 226

Гольцева Ю.Д., Дергилев К.В., Белоглазова И.Б., Болдырева М.А., Парфенова Е.В.

Роль урокиназного рецептора в регуляции периваскулярной ниши сердца и развитии фиброза. 228

Гончаренко А.В., Жамгочан Х.Х., Шумков М.С.

Рекомбинантные пробиотики как векторы для доставки регуляторных полипептидов в желудочно-кишечный тракт. 230

Горностаева А.Н., Матвеева Д.К., Кочетова Э.С., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

Характеристика внеклеточного матрикса и ассоциированных с ним молекул, продуцируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками из разных тканевых источников 232

<i>Городилова А.В., Абдрахманова И.И., Филин И.Ю., Чернов В.М., Ризванов А.А., Соловьева В.В.</i>	
Исследование противоопухолевых эффектов генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани на моделях глиобластомы <i>in vitro</i>	234
<i>Городничева Т.В., Бавыкин А.С., Молодцова А.А., Ребриков Д.В.</i>	
Масштабируемая система персонализированного изготовления AAV-генопрепаратов	236
<i>Горохова А.В., Насибов Т.Ф., Порохова Е.Д., Старосветская А.А., Бариев У.А., Носов В.Е., Казанцева Е.А., Акимова Е.Б., Комарова Е.Г.</i>	
Остеогенные свойства композитных кальций-фосфатных покрытий, несущих слой биodeградируемого полимера с инкорпорированным интерфероном-альфа	238
<i>Градов О.В., Градова М.А.</i>	
Пьезоэлектрические скаффолды как тераностические электроцелтики в электростимулируемой и механостимулируемой регенерации возбудимых тканей	240
<i>Гребнев Д.Ю., Иванов В.А., Маклакова И.Ю., Базарный В.В., Гаврилов И.В.</i>	
Активации регенерации миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения с использованием стволовых клеток с измененной в них аутофагией	242
<i>Григорьев Т.Е., Антипова К.Г., Загоскин Ю.Д., Крупнин А.Е., Храмова Е.А., Ужакова Э.А., Базылева К.Ю., Фомина Ю.С., Чвалун С.Н.</i>	
Функциональные полимерные материалы для тканевой инженерии: структура и свойства	244
<i>Гринчук Т.М., Шорохова М.А.</i>	
Роль цитогенетического анализа при использовании мезенхимных стволовых клеток в регенеративной медицине	246
<i>Громова Е.С., Переплетчикова Д.А., Карелкин В.В., Малашичева А.Б.</i>	
Влияние динамических изменений уровня транскрипционного фактора Runx2 на остеогенную дифференцировку клеток и сигнальный путь Notch	248
<i>Грошева А.Г., Куралесова А.И., Генкина Е.Н.</i>	
Как это было. История открытия стволовых стромальных клеток и разработка метода их культивирования	250
<i>Груздева О.В., Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Слесарева Т.А., Сеницкий М.Ю., Матвеева В.Г., Горбатовская Е.Е., Долматова С.Е.</i>	
Оценка остеогенного потенциала мезенхимальных стволовых клеток эпикардиальной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца	252
<i>Губский И.Л., Докукин Н.В., Шап М.О., Кибирский П.Д., Наместникова Д.Д., Губский Л.В., Баклаушев В.П.</i>	
Корреляция данных МР-трактографии при травме спинного мозга с данными гистологического исследования плотности соединительной ткани	254
<i>Гузенко В.В.</i>	
Влияние точечного ацетилирования E2F1 по лизину 117 или 125 на апоптоз нейронов после ишемического повреждения	256
<i>Гунбин К.В., Копеина Г.С., Животовский Б.Д., Замараев А.В.</i>	
Исследование белков CD1 у грызунов: эволюционные изменения и их влияние на иммунную систему	258
<i>Гурбо В.Э., Антонец Н.Г., Гончаров А.Е., Докукина Т.В., Голубева Т.С.</i>	
Оценка дифференцировочного потенциала моноцитов в микроглиальном направлении у пациентов с шизофренией в сравнении со здоровыми добровольцами	260
<i>Гуренков А.Д., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Парфёнова Е.В., Дергилёв К.В.</i>	
Участие аутофагии в формировании миофибробластов и развитии фиброза сердца <i>in vivo</i>	262
<i>Гурьев Н.А., Иванова Ю.С., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.</i>	
Активность антиоксидантной системы индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и их дифференцированных потомков в условиях окислительного стресса	264
<i>Давиденко А.В., Климина К.М., Султанов Р.И., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А.</i>	
Иммунный фенотип астроцитов, полученных из ИПСК пациентов со спиноцеребеллярной атаксией 17-го типа	266
<i>Даюб К., Камалов М.И., Авдокушина С.М., Салахиева Д.С., Абдуллин Т.И., Зухайб М.</i>	
Характеристика пористого гидрогеля на основе олиго(полиэтиленгликольфумарата) в качестве матрикса для нейрорегенерации	268
<i>Дарвиш Д.М., Титова А.Р., Александрова С.А.</i>	
Остеоиндуктивный биокомпозит на основе фибриллярного коллагена и фиброина шелка: получение, характеристика, оценка остеоиндуктивности	270
<i>Дворяшина И.А., Великородная Ю.И.</i>	
Роль мезенхимальных клеток и сигнального пути HGF/c-Met в репаративной регенерации печени после химического фиброза	272

<i>Дебенко С.С., Слижов П.А.</i>	
Протеины шелка тутового шелкопряда как перспективный биоматериал для регенеративной медицины	274
<i>Демченко А.Г., Балясин М.В., Табаков В.Ю., Амелина Е.Л., Смирнихина С.А.</i>	
Легочные органоиды из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: перспективная модель для скрининга терапии муковисцидоза	276
<i>Демьяненко С.В.</i>	
Регуляция активности фактора транскрипции с-Мус для выживания и восстановления нейронов	278
<i>Денисова Е.В., Абрамович Р.А.</i>	
Особенности производства биологических лекарственных препаратов с точки зрения регуляторной практики	280
<i>Дергилев К.В., Цоколаева З.И., Зубкова Е.С., Белоглазова И.Б., Гольцева Ю.Д., Ратнер Е.И., Парфенова Е.В.</i>	
Использование секретомы клеток кардиосфер для направленной регуляции свойств клеток эпикардального микроокружения и репаративных процессов в сердце	282
<i>Дергилев К.В., Азимова Е.Л., Цоколаева З.И., Белоглазова И.Б., Болдырева М.А., Ратнер Е.И., Ярушкина И.С., Парфенова Е.В.</i>	
Исследование воздействия клеточных пластов, сформированных из HGF-продуцирующих мезенхимальных стромальных клеток, на репаративные процессы в сердце после криповреждения	284
<i>Дзариева Ф.М., Головин А.В., Павлова Г.В.</i>	
Влияние EGFR и EGFRVIII-специфичного аптамера Gol1 на гены сигнальных путей клеток глиобластомы человека	286
<i>Дзряян В.А., Бродский И.Б., Сысоева В.Ю., Климович П.С., Рубина К.А.</i>	
Участие Т-кадгерина и активация сигнальных путей ERK и AMPK в процессе адипогенной дифференцировки	288
<i>Диденко Н.Н., Долгалев А.А., Бобрышев Д.В., Чонишвили Д.З., Адешелидзе С.Р.</i>	
Исследование биосовместимости новых образцов титанового сплава для дентальной имплантологии <i>in vitro</i>	290
<i>Долгополов И.С., Брюховецкий А.С., Коваленко Н.И., Ставров Д.С., Шпилова А.Н.</i>	
Иммунологические и генетические аспекты клинического применения эпигенетически модифицированных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аГСК) при боковом амиотрофическом склерозе (БАС)	292
<i>Домнина А.П., Кунеев И.К., Корнилова А.И., Соколова А.В., Иванова Ю.С., Нащечкина Ю.А., Люблинская О.Г.</i>	
Пациент-специфичные трехмерные клеточные модели тканей матки	294
<i>Дорофеева А.И., Шипунова И.Н., Никифорова К.А., Гальцева И.В., Лучкин А.В., Фидарова З.Т., Михайлова Е.А.</i>	
Влияние тромбоцитопении на свойства стромальных предшественников кроветворного микроокружения при апластической анемии	296
<i>Дорофеева А.И., Савватеева Т.Ф., Шипунова И.Н.</i>	
Возрастные изменения спектра дифференцировочного потенциала индивидуальных колоний стромальных предшественников из костного мозга человека	298
<i>Доценко Е.Д., Толстова Т.В., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г.</i>	
Влияние активации TLR3 на иммуносупрессивные свойства мезенхимальных стромальных клеток	300
<i>Дудорова А.А., Балясин М.В., Марков Н.М., Новиков М.М., Ефименко М.В., Ляндуп А.В., Осипова Е.Ю., Фадеева И.В.</i>	
Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека в 3D-культурах на скаффолдах из трикальций-фосфата	302
<i>Дылева Ю.А., Белик Е.В., Учасова Е.Г., Горбатовская Е.Е., Долматова С.Е., Груздева О.В.</i>	
Оценка плеотропных эффектов метформина на уровень церамидов в адипоцитах жировых депо сердца у пациентов с ишемической болезнью сердца	304
<i>Дьячкова У.Д., Басалова Н.А., Виговский М.А., Лазарев Р.Е., Попов В.С., Лагерева Е.А., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А.</i>	
Разработка моделей для оценки биологической активности нового антифибротического препарата на основе везикулярной фракции секретомы мезенхимных стромальных клеток человека	306
<i>Дьячкова У.Д., Гарджук А.А., Евдокимов П.В., Мурашко А.М., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А.</i>	
Тканеспецифичность внеклеточного матрикса, секретируемого мезенхимными стромальными клетками человека, и его использование для увеличения индуктивных свойств остеопластических материалов	308
<i>Евсеева М.Н., Шилова А.А., Рубцов Ю.П., Кулебякин К.Ю.</i>	
Гомеобоксный фактор транскрипции Nfix регулирует накопление жира в гепатоцитах	310
<i>Егораева А.А., Манжуло И.В., Ивашкевич Д.Н., Пономаренко А.И.</i>	
Этанолamid стеариновой кислоты модулирует процесс нейровоспаления при легкой черепно-мозговой травме у мышей	312
<i>Егорихина М.Н., Тимофеева Л.Б., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Линькова Д.Д., Фарафонтон Е.А., Рябков М.Г., Алейник Д.Я.</i>	
Восстановление кожного покрова при применении оригинального эквивалента кожи — доклинические исследования	314

<i>Егоров В.С., Филимонов А.Ю., Чудных С.М., Абдувосидов Х.А., Чекмарева И.А., Паклина О.В., Баранчугова Л.М.</i>	
Морфологическая характеристика регенерации инфицированных ран при воздействии высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения	316
<i>Ельчанинов А.В., Вишнякова П.А., Фатхудинов Т.Х.</i>	
Репаративная регенерация селезенки после аутологичной трансплантации под кожу	319
<i>Енукашвили Н.И., Пономарцев Н.В., Соловьева А.И., Гуца Е.А., Белик Л.А., Волков В.В.</i>	
Роль некодирующих РНК в канцерогенезе и формировании опухолевого микроокружения	321
<i>Еремеев А.В., Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С.</i>	
Исследование биораспределения препарата тканевой инженерии на основе дифференцированных в хондроциты ИПСК при имплантации иммунодефицитным мышам	323
<i>Еремичев Р.Ю., Хандошин М.М., Александрюшкина Н.А., Макаревич П.И.</i>	
Тканеспецифичные функции стромальных клеток человека при формировании соединительных тканей и регенерации	325
<i>Ермакова В.В., Александрова Е.В., Томилин А.Н., Кузьмин А.А.</i>	
Изучение цис-регуляторных взаимодействий гена <i>Pou5f1</i> в плюрипотентных и дифференцированных клетках мышей	327
<i>Ермакова Н.Н., Жукова М.А., Пан Э.С., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г.</i>	
Реакция мезенхимальных стволовых клеток и клеток неоваскулогенеза на терапию репрограммированными CD8 ⁺ Т-лимфоцитами карциномы легкого Льюис	329
<i>Ермакова П.С., Васильчикова Е.А., Батенькин М.А., Богомолова А.Ю., Луговая Л.А., Чесноков С.А., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кашина А.В.</i>	
Биоинженерный трансплантат на основе инкапсулированных островков Лангерганса	331
<i>Ермаков И.М., Постников А.Б., Серебряная Д.В.</i>	
Исследование RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при моделировании сенесцентного фенотипа в первичной нейроглиальной культуре под действием этопозида	333
<i>Ерофеева Л.М., Дорохович Г.П.</i>	
Особенности регенерации тимуса и красного костного мозга мышей после однократного облучения ускоренными ионами углерода	335
<i>Ерошенко М.Н., Грехнёв Д.А., Лебедева О.С., Воловиков Е.А., Беликова Л.Д., Вигонт В.А.</i>	
Повышенный уровень STIM1 опосредует увеличенную активность депо-управляемых кальциевых каналов в дофаминергических нейронах, специфичных для пациентов с болезнью Паркинсона	337
<i>Ершов Б.П., Антошин А.А., Волошин С.Ю., Гилязова А.Н., Христидис Я.И., Истранова Е.В., Файзуллин А.Л., Бутнару Д.В., Тимашев П.С.</i>	
Применение коллагеновых матриц с Янус-структурой в модели аугментационной уретропластики у кроликов	339
<i>Ефлова Д.С., Немтарев А.В., Кузнецова Е.В., Ергешов А.А., Муллин Р.И., Абдуллин Т.И.</i>	
Некоторые антибактериальные и регенеративные эффекты биополимерных комплексов серебра в модели инфицированной раны кожи	341
<i>Ефлова Д.С., Ергешов А.А., Галлямов А.Р., Абдуллин Т.И., Муллин Р.И.</i>	
Разработка способа децеллюляризации периферических нервов	343
<i>Жданов Д.Д., Блинова В.Г., Гладилина Ю.А., Шишпарёнок А.Н., Абрамова А.А., Елисеева Д.Д.</i>	
Модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами для индукции пролиферации и супрессорной активности регуляторных Т-клеток пациентов с аутоиммунными заболеваниями	345
<i>Жоламанова С.Ж., Ступникова Т.В., Бекназар А.Н., Оразалы А.Б., Савельева А.Е.</i>	
Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток при расстройстве аутистического спектра	347
<i>Жукова М.А., Ермакова Н.Н., Пан Э.С., Дыгай А.М., Скурихин Е.Г.</i>	
Ингибирование MAPK/ERK и PD-1 для борьбы с истощением и повышения цитотоксичности CD8 ⁺ Т-клеток: разработка нового подхода терапии рака легкого	349
<i>Жукова О.А., Басманов Д.В., Прусаков К.А., Столяров В.Ю., Колесов В.В., Горбачев И.А., Кузнецова И.Е., Сидорук К.В., Богущ В.Г., Зыков К.А., Баклаушев В.П.</i>	
Разработка <i>in vitro</i> микрофлюидного устройства «легкое-на-чипе»	351
<i>Забокрицкий Н.А.</i>	
Новое биосоединение и экспериментальная оценка его регенеративных свойств	353
<i>Завьялов А.О., Астрелина Т.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Меркулов М.В., Маливанова Т.Ф., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Бульчева Ю.И., Никитина В.А., Михадаркина О.Г., Дубова Е.А., Лишук С.В., Цимахович А.О., Серова О.Ф., Самойлов А.С.</i>	
Сравнение применения раневых покрытий из внеклеточного матрикса амниотической оболочки при химических ожогах	355
<i>Загоскин Ю.Д., Токаев Т.К., Синицын М.В., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н.</i>	
Пористые полимерные каркасы с импрегнированными противотуберкулезными средствами для торакальной хирургии	357

<i>Закопайко Б.А., Товлеко Д.В., Слизов П.А., Марченко Д.М., Кондратенко А.А., Александрова С.А., Калужная Л.И.</i>	
Исследование влияния гидролизата матрикса вартонова студня пуповины человека на мезенхимные стволовые клетки с целью дальнейшего использования его для регенерации хрящевой ткани	359
<i>Замараев А.В., Мамедова А.Р., Копейна Г.С., Животовский Б.Д.</i>	
Экспрессия генов, регулирующих процессы порообразования в иммуногенной гибели клеток	361
<i>Захаревич А.А., Загоскин Ю.Д., Власова А.Е., Григорьев Т.Е.</i>	
Высокопористые микрочастицы на основе олеофильного N-фталоилхитозана	363
<i>Захарова И.С., Шевченко А.И., Слепцов А.А., Назаренко М.С., Троян Н.А., Зуева А.С., Арсан МХД А., Елисафенко Е.А., Медведев С.П., Шевченко В.А., Зарубин А.А., Ежов М.В., Кухарчук В.В., Парфёнова Е.В., Закиян С.М.</i>	
От клеточных моделей к пониманию молекулярных основ патогенеза семейной гиперхолестеринемии	365
<i>Захарченко А.Е., Домнин П.А., Медведев М.А., Грошева А.Г., Акишев Ю.С., Ермолаева С.А.</i>	
Низкотемпературная аргоновая плазма стимулирует пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток	367
<i>Зиновьева А.А., Бахчинян Е., Каменков С.С., Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю.</i>	
Возраст-ассоциированные изменения кальциевой сигнализации в мультипотентных мезенхимных стволовых клетках	369
<i>Зиновьева А.С., Томилин А.Н., Бахмет Е.И.</i>	
Выявление ключевых аминокислот транскрипционного фактора Oct4, обеспечивающих гетеродимеризацию Sox2-Oct4 в плюрипотентных стволовых клетках мыши	371
<i>Зобкова Ю.О., Петракова Н.В., Комлев В.С., Свиридова И.К., Сергеева Н.С., Чердынцева Т.А.</i>	
Разработка биокерамики на основе церий-содержащих фосфатов кальция с антибактериальными свойствами	373
<i>Зорохович Д.А., Комарова С.О., Морозова Е.Б., Воронцов П.А., Шмигельский Е.А., Пшеничников С.Е., Антипова В.Н.</i>	
Биосовместимые нанокompозитные материалы для тканевой инженерии	375
<i>Зубкова Е.С., Калинин А.П., Меньшиков М.Ю., Парфенова Е.В.</i>	
Кокультивирование мезенхимальных стромальных клеток и лимфоцитов в 3D-условиях, как модель третичных лимфоидных структур	377
<i>Зуева А.С., Шевченко А.И., Медведев С.П., Закиян С.М., Захарова И.С.</i>	
CRISPR/Cas9-опосредованная коррекция гена <i>LDLR</i> на модели ИПСК пациентов с семейной гиперхолестеринемией	379
<i>Иванова В.П.</i>	
Полимеры в регенеративной медицине	381
<i>Иванова Е.И., Файзуллин А.Л., Гринин В.О., Тимашев П.С.</i>	
Применение искусственного интеллекта для диагностики отторжения почечных трансплантатов: перспективы в регенеративной медицине	383
<i>Иванова Ю.С., Гурьев Н.А., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.</i>	
Изменение антиоксидантной активности при старении и ревитализации мезенхимных стволовых клеток человека	385
<i>Ивановская Е.В., Войтенко Д.А., Мишуков А.А., Свешникова А.Н.</i>	
Влияние гиалуроновой кислоты и поперечно-сшитых продуктов на фибробласты кожи человека	387
<i>Ивлева А.И., Бикмулина П.Ю., Кошелева Н.В., Тимашев П.С.</i>	
3D-биопечать с использованием органоидов и децеллюляризованного матрикса для создания релевантных тест-моделей <i>in vitro</i> ...	389
<i>Игнатъева М.В., Токтохоева Л.Н., Дёмина Е.С., Намсрайн С.Г., Цыбденова А.П., Дашиинимаев Э.Б., Балханов Ю.С.</i>	
Роль лизата тромбоцитов человека в стимуляции пролиферации кератиноцитов при создании тканеинженерной конструкции	391
<i>Игнатъева Н.В., Куренкова А.Д., Пацюркевич А.А., Мосина З.А., Гаврилов Н.С., Тимашев П.С., Медведева Е.В.</i>	
Оценка регенеративного потенциала хрящевых конструкторов на основе CD73 ⁺ хондропрогениторных клеток суставного хряща	394
<i>Ираклионова Н.С., Гилевич И.В., Басанкин И.В., Гользатян А.А., Грицаев И.Е., Тюрский Д.А.</i>	
Ортобиологические технологии в спинальной хирургии	396
<i>Исаева М.О., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н.</i>	
Стимулирующее действие янтарной кислоты на миогенез клеточной линии C2C12 через SUCNR1	398
<i>Калабушева Е.П., Бутова Е.А., Роговая О.С., Черкашина О.Л., Воротеляк Е.А.</i>	
YAP/TAZ в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов человека	400
<i>Калинина Н.И.</i>	
Макрофаги в поддержании клеточного состава тканей	402
<i>Калинин А.П., Зубкова Е.С., Меньшиков М.Ю., Парфёнова Е.В.</i>	
Роль интегрированного стрессорного ответа в развитии сенесценции мезенхимальных стволовых клеток	403

<i>Калинин К.Т., Седуш Н.Г., Малахов С.Н., Крупнин А.Е., Спирин О.А., Аганесов А.Г., Чвалун С.Н.</i>	
Нанесение гидроксиапатитного покрытия на поверхность пористых PLA скаффолдов, полученных методом 3D-печати	405
<i>Каменков С.С., Кулебякин К.Ю., Антропова Ю.Г., Зиновьева А.А., Бахчинян Е., Тюрин-Кузьмин П.А., Чечехина Е.С.</i>	
Изменение распределения РТЕН в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при старении	407
<i>Каменцева Р.С., Кошеверова В.В., Харченко М.В., Корнилова Е.С.</i>	
Аутофагия в эндометриальных мезенхимных стромальных клетках человека в разных условиях культивирования	409
<i>Каминская Я.П., Ильчибаева Т.В., Науменко В.С., Цыбко А.С.</i>	
Влияние секреции дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) на его нейротрофные свойства	411
<i>Карагяур М.Н., Базов К.Д., Примак А.Л., Шелег Д.А., Арбатский М.С., Джауари С.С., Илларионова М.Е., Семина Е.В., Самоходская Л.М., Климович П.С., Чечехин В.И., Попов В.С., Рубина К.А., Макусь Ю.В., Цыганков Б.Д., Ткачук В.А., Нейфельд Е.А.</i>	
Поиск и установление функции морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием когнитивных и психических расстройств	413
<i>Карагяур М.Н., Примак А.Л., Басалова Н.А., Монакова А.О., Джауари С.С., Толстолужинская А.Е., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И., Кулебякина М.А., Чечехина Е.С., Виговский М.А., Усачёв В.А., Чечехин В.И., Яковлева Т.К., Турилова В.И., Шагимарданова Е.И., Газизова Г.Р., Кулебякин К.Ю., Сысоева В.Ю., Базов К.Д., Попов В.С., Аюбян Ж.А., Ткачук В.А.</i>	
Иммортализованные мезенхимные стромальные клетки человека как платформа для разработки лекарственных препаратов для регенеративной медицины.	416
<i>Каралкин П.А., Кудрин К.Г., Святославов Д.С., Усатов Д.А., Решетов И.В.</i>	
Биомиметические подходы к усилению регенеративного потенциала персонализированных костных титановых имплантатов	418
<i>Кардов А.В., Бикмулина П.Ю., Ревокатова Д.П., Ефремов Ю.М., Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С.</i>	
Подходы к формированию и характеристике органоидов на основе различных типов клеток.	420
<i>Карпенко Д.В., Капранов Н.М., Бигильдеев А.Е.</i>	
Сильные иммунные привилегии позволяют Nes-GFP ⁺ стволовым клеткам выживать при трансплантации в реципиента, иммунизированного GFP	422
<i>Карпенко Д.В., Бигильдеев А.Е.</i>	
Воспаление стимулирует регенеративный потенциал стволовой системы и вызывает формирование воспалительной памяти в кроветворной территории.	424
<i>Карсунцева Е.К., Воронова А.Д., Степанова О.В., Фурса Г.А., Шишкина В.С., Чадин А.В., Чехонин В.П.</i>	
Эффективность билатеральной трансплантации трансдуцированных обкладочных клеток, экспрессирующих нейротрофический фактор BDNF, в гиппокамп крыс в терапии экспериментальной болезни Альцгеймера	425
<i>Катаев В.С., Федотов М.А.</i>	
Применение коллоидных наночастиц селена, получаемых методом лазерной абляции, для профилактики и лечения диабета II типа.	427
<i>Кветной И.М., Пальцев М.А.</i>	
Мелатонин и мезенхимальные стволовые клетки: молекулярная репарация митохондриальных белков	429
<i>Кисель А.А., Исаева Е.В., Якимова А.О., Барановский Д.С., Клабуков И.Д., Иванов С.А., Шегай П.В., Каприн А.Д.</i>	
Влияние гидрогелевого состава на основе коллагена высокой концентрации и желатиновых гранул для экструзионной 3D-биопечати на хондрогенную дифференцировку культуры ММСК-ЖТ	431
<i>Клабуков И.Д., Барановский Д.С., Евстратова Е.С., Якимова А.О.</i>	
Переходные коннекторы производственных модулей — потенциальный объект для регулирования и мониторинга мобильных производств высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов	433
<i>Клабуков И.Д., Атякшин Д.А., Барановский Д.С., Игнатюк М.А., Кисель А.А., Якимова А.О., Шегай П.В., Каприн А.Д.</i>	
Иммунология регенерации хрящевой ткани: участие тучных клеток в модификации иммунологической реакции на тканеинженерную конструкцию трахеи	435
<i>Клабуков И.Д., Савостьянов Г.А.</i>	
Новый подход к изучению пространственной организации многоклеточности	437
<i>Клабуков И.Д., Барановский Д.С., Якимова А.О., Евстратова Е.С.</i>	
Система карт контрольных проверок на производстве персонализированных биомедицинских клеточных продуктов по индивидуальным назначениям	439
<i>Ключевев Т.О., Юрканова М.Д., Пешкова М.А., Кошелева Н.В., Власова И.И., Тимашев П.С.</i>	
Модуляция воспалительного ответа макрофагов экзосомами и матрикс-связанными нановезикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека	441

<i>Кобзева И.В., Астрелина Т.А., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Михадаркина О.Г., Маливанова Т.Ф., Самойлов А.С.</i>	
Стромально-васкулярная фракция жировой ткани в персонифицированной медицине	443
<i>Кобзев М.В., Пыхтина П.А., Хабекирова С.А., Диденко Н.Н.</i>	
Выделение экзосом МСК при помощи магнитной сепарации	445
<i>Ковалев А.В., Левин А.А., Петров С.В., Кудан Е.В., Сенатов Ф.С., Мионов В.А.</i>	
Тканевые сфероиды как строительные блоки для 3D-биопечати	447
<i>Ковалев А.В.</i>	
Клеточные сфероиды в составе тканеинженерных скелетогенных оболочек	449
<i>Ковалева К.В., Постников А.Б., Серебряная Д.В.</i>	
Разработка модельной системы для исследования RAPP-A-специфичного протеолиза IGFBR-4 при фибротических изменениях в первичной культуре кардиофибробластов	451
<i>Ковалева П.А., Черемных А.И., Булыгина И.Н., Сенатов Ф.С.</i>	
Исследование эффекта памяти формы композиционных материалов на основе ПЛА с различной надмолекулярной структурой для применения в тканевой инженерии	453
<i>Коваленко Е.И., Алексеева Н.А., Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Стрельцова М.А.</i>	
Гетерогенность пролиферативного ответа НК-клеток в зависимости от стадии дифференцировки при накоплении <i>in vitro</i>	455
<i>Коваль О.А., Жильникова М.В., Зверева С.П., Бирюков М.М., Варламов М.Е., Станишевская О.М., Черных Д.В., Атаманов В.В.</i>	
Продукция VEGF-A в условиях гипоксии и взаимосвязь с потенциалом к метастазированию клеток увеальной меланомы человека	457
<i>Ковальская К.В., Малов С.Л., Манукян Г.В., Багмет Н.Н., Холоденко Р.В., Ярыгин К.Н., Холоденко И.В.</i>	
Влияние эффероцитоза апоптотических телец, полученных из клеток глиомы, на фенотип клеток-реципиентов	459
<i>Козин В.В.</i>	
Экспериментальный поиск эволюционно консервативных регуляторов регенерации аннелид на модели восстановления задних сегментов тела у полихеты <i>Alitta virens</i>	461
<i>Козлова М.Н., Земсков В.М., Алексеев А.А., Демидова В.С., Филимонов К.А.</i>	
Комплексный анализ иммунного статуса для оценки регенераторного потенциала у пациентов с обширными ожогами	463
<i>Кокаев Р.И., Ислаев А.А., Кокаев Г.С.</i>	
Возможности профилактики эффектов гипергликемии и конечных продуктов гликирования в культуре мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов	465
<i>Колесникова В.А., Копылов А.М., Павлова Г.В.</i>	
Влияние комбинации GQIcombi на пролиферативную активность глиом разной степени злокачественности	467
<i>Колесникова И.С., Бельчиков В., Славина М.Ю., Симакина Д.К., Трахтман П.Е., Свешникова А.Н.</i>	
Исследование влияния метода приготовления сыворотки на основе тромбоконцентратов на пролиферацию клеток	469
<i>Колесниченко Ю.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н., Шевцов М.А., Юдинцева Н.М.</i>	
Сравнительный анализ митохондриальной активности и уровней активных форм кислорода в нормальных и рубцовых фибробластах дермы	471
<i>Колос Е.А., Яковлев В.С., Бекетова А.А.</i>	
Белок коннексин-43 в клетках пограничной шапочки дорсального и вентрального корешков спинного мозга крысы (сравнительное исследование)	473
<i>Кондратенко А.А., Басок Ю.Б., Григорьев А.М., Товпеко Д.В., Калюжная Л.И.</i>	
Лиофилизированный внеклеточный матрикс пуповины человека для тканевой инженерии	475
<i>Копляниников М.А., Замулаева И.А., Харин А.Ю., Еремина А.С., Каргина Ю.В., Ле-Дейген И.М., Базыленко Т.Ю., Матчук О.Н., Абрамова М.Р., Кальсин В.А., Кузнецова С.М., Тимашёв П.С., Баклаушев В.П., Тимошенко В.Ю.</i>	
Мезопористые кремниевые наночастицы с салиномицином для противораковой терапии	477
<i>Константинова С.В., Бокша И.С., Гришин А.В., Лунин В.Г.</i>	
Медицинское применение стрептококковых эндопептидаз	479
<i>Коптева А., Герасимова Д.С., Минина А.С., Шуплецова В.В., Молоканова (Москалюк) О.А.</i>	
Жизнеспособность и остеодифференцировка ММСК на полимерных 2,5D-каркасах	481
<i>Копылова И.В., Казакова А.Н., Грехнев Д.А., Скородумова Л.О., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Вигонт В.А., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А., Лебедева О.С.</i>	
Митохондриальная ДНК как активатор нейровоспаления при болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2	483

<i>Копылов Е.Д., Пресняков Е.В., Бозо И.Я., Деев Р.В.</i>	
Экспериментальное исследование влияния гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты с рDNA-VEGF на регенерацию кожи	485
<i>Корнилова Е.С.</i>	
Особенности регуляции ЭФР-рецепторной системы в культивируемых мезенхимных клетках человека	487
<i>Коровина Д.Г.</i>	
Сравнение контактного и паракринного путей воздействия при миогенной дифференцировке мезенхимных стволовых/стромальных клеток животных	489
<i>Коротких А.Г., Сазонов С.В.</i>	
Изменение уровней экспрессии Ki67 И NSE при репаративной регенерации миелиновых нервных волокон в периферическом нерве с использованием углеродных нанотрубок в модели <i>in vivo</i>	491
<i>Костандян Е.С., Цырульников С.А., Лукина Ю.С., Дятлов В.А.</i>	
Инъекционные костные пасты на основе полисахаридов для заполнения костных дефектов	494
<i>Костоломова Е.Г., Полянских Е.Д., Тимохина Т.Х.</i>	
Влияние супернатанта <i>Bifidobacterium bifidum</i> на синтез основных компонентов внеклеточного матрикса дермальными фибробластами в эксперименте <i>in vitro</i>	496
<i>Косых А.В., Жигмитова Е.Б., Гурская Н.Г., Ребриков Д.В.</i>	
Доставка путем внутрикожной инъекции и транзientной трансфекции плазмиды, кодирующей коллаген 7 на модели мыши.	498
<i>Котенева П.И., Бикмулина П.Ю., Ефремов Ю.М., Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С.</i>	
Биофабрикация биоэквивалентов уретры из сфероидов буккального эпителия и мезенхимных стромальных клеток (МСК)	500
<i>Котов М.А., Каменцева Р.С., Харченко М.В., Кошеверова В.В., Корнилова Е.С.</i>	
Влияние синтеза <i>de novo</i> на регуляцию уровня рецептора эпидермального фактора роста (рЭФР) при ЭФР-опосредованной стимуляции в мезенхимных стромальных клетках человека.	502
<i>Кошеверова В.В., Каменцева Р.С., Харченко М.В., Шварц А.П., Корнилова Е.С.</i>	
ЭФР-рецепторная система в мезенхимных стромальных клетках человека: экспрессия рецепторов семейства ErbB и влияние лигандов рецептора ЭФР на пролиферацию клеток	504
<i>Кошелева Н.В., Пешкова М.А., Корнеев А.А., Ревокатова Д.П., Власова И.И., Ключевев Т.О., Шпичка А.И., Тимашев П.С.</i>	
Секретом мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека в условиях 2D- и 3D-культур.	506
<i>Кравченко С.В., Трофименко А.И., Сухно И.В.</i>	
Опыт настройки экструзионного биопринтера для формирования паттернов из дискретных капель	508
<i>Красковская Н.А., Парфенова П.С., Булычев М.А., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.</i>	
Разработка новой персонализированной модели болезни Хантингтона	510
<i>Кривова Ю.С., Прошина А.Е., Отлыга Д.А., Харламова А.С., Годовалова О.С.</i>	
Распределение прогормон конвертазы 1/3 в развивающейся поджелудочной железе человека.	512
<i>Кригер Д.В., Поденкова У.И., Бахмет Е.И., Томилин А.Н., Цимоха А.С.</i>	
Экспрессия генов иммунопротеасом на ранних этапах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши.	514
<i>Крочищева П.А., Свиридова И.К., Гольдберг М.А., Хайрутдинова Д.Р., Ахмедова С.А., Кирсанова В.А., Сергеева Н.С., Комлев В.С.</i>	
Подходы к созданию биорезорбируемых цементных материалов для замещения костных дефектов	516
<i>Кручинина А.Д., Разматулина Л.А., Глумскова Ю.А., Венедиктов А.А.</i>	
Исследование структуры децеллюляризованных коллагеновых матриксов на основе ксеноперикарда	518
<i>Кручинина А.Д., Попова П.А., Глумскова Ю.А., Венедиктов А.А.</i>	
Оценка биосовместимости скаффолдов на основе коллагенового гидрогеля.	520
<i>Кудан Е.В.</i>	
Возможности трехмерной биопечати в тканевой инженерии и регенеративной медицине	522
<i>Кузин С.М.</i>	
Особенности пролиферации клеток эпителия пищевода мышей, синхронизированных и рассинхронизированных с циркадианным ритмом митозов	524
<i>Кузнецова В.С., Синельникова В.А., Васильев А.В., Лосев Ф.Ф.</i>	
Действие веществ, потенциально усиливающих остеоиндуктивное действие BMP-2.	526
<i>Кузнецова М.А., Борхунова Е.Н.</i>	
Стимуляция репаративного остеогенеза с помощью секретома ММСК	528

<i>Кузнецов Е.С., Ветров М.А., Гатило Ю.Ю.</i>	
Цитопротективный эффект секрета МСК в модели оксидативного стресса <i>in vitro</i>	530
<i>Кулебякина М.А., Бутузова Д.А., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.</i>	
Механизмы паракринного контроля дифференцировки фибробластов в миофибробласты мезенхимными стромальными клетками: роль растворимых белковых факторов	532
<i>Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Волошин Н.С., Усачев В.А., Чехехин В.И., Воронцова М.В.</i>	
Роль малых субпопуляций МСК в контроле обновления жировой ткани	534
<i>Кулинич С.С., Зафранская М.М., Гаин Ю.М.</i>	
Влияние трансформирующего фактора роста-В1 на активацию миогенного потенциала и антипролиферативные свойства мезенхимальных стромальных клеток <i>in vitro</i>	536
<i>Кунеев И.К., Корнилова А.И., Петрова В.В., Поникарова А.Н., Нащекина Ю.А., Домнина А.П.</i>	
Изменение тканеспецифического профиля экспрессии генов эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека при переходе к 3D-культивированию	538
<i>Куралесова А.И., Пронин А.В., Грошева А.Г., Генкина Е.Н.</i>	
А.Я. Фриденштейн: Открытие стволовых стромальных клеток	540
<i>Курбанов Д.С., Неофитов И.С., Билялов А.И., Филатов Н.С., Титова А.А., Шагмарданова Е.И., Гусев О.А., Киясов А.П.</i>	
Оценка регенерации эластического хряща игольчатых мышей <i>Acomys cahirinus</i> трёх возрастных групп	542
<i>Куркова К.И., Тверье Е.А., Карпов Д.С., Соловьева Е.В., Пантелеев А.А.</i>	
Использование методов Cre-Lox-рекомбинации и CRISPR/Cas9 для получения эпидермальных кератиноцитов с нокаутом по гену <i>Hif1a</i>	544
<i>Куровский Е.Б., Гусев К.О., Грехнёв Д.А., Новикова Ю.В., Скобелева К.В., Глушанкова Л.Н., Вигонт В.А., Казначеева Е.В.</i>	
Взаимовлияние кальциевой сигнализации и провоспалительного пути STING.	546
<i>Лазарев Р.Е., Монакова А.О., Басалова Н.А., Попов В.С., Ефименко А.Ю.</i>	
<i>Лапина Е.С., Соловьев Д.А., Александр-Синклер Э.И.</i>	
Разработка биосовместимого бесклеточного коллагенового гидрогелевого раневого покрытия, несущего антисептические препараты ..	550
<i>Ласков И.Г., Маланин Д.А., Демещенко М.В., Бурка И.С., Володин И.В., Кондрашенко В.В.</i>	
Тендопротективное действие обогащенной тромбоцитами плазмы в условиях экспериментальной тендинопатии: регуляция матричных металлопротеиназ	552
<i>Лебедева А.И., Мусина Л.А., Гареев Е.М., Шангина О.Р., Галаутдинов М.Ф., Терезулов И.И.</i>	
Применение фармакупунктуры диспергированным аллогенным биоматериалом для акто- и кардиопротекции после изнуряющей физической нагрузки в эксперименте	554
<i>Лебедев В.Н., Дейнеко Д.В.</i>	
Синтез и исследование антибактериальных фосфатов кальция, содержащих катионы стронция, самария и цинка, для костной инженерии ..	556
<i>Левичева Е.А., Егорихина М.Н., Боков А.Е., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П., Линькова Д.Д., Фарафонтובה Е.А., Алейник Д.Я.</i>	
Биологические характеристики материалов на основе полиуретана	557
<i>Лимаев И.С., Емелин А.М., Карокин М.В., Яковлев И.А., Покровский В.М., Кузубова Е.В., Деев Р.В.</i>	
Влияние AAV-опосредованной доставки гена <i>DYSF</i> на проявления регенерации скелетных мышц мышей с дисферлинопатией ...	559
<i>Линькова Д.Д., Егорихина М.Н., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Фарафонтובה Е.А., Левичева Е.А., Алейник Д.Я.</i>	
Особенности функциональной активности МСК в различных 3D-структурах при нормоксии и гипоксии	561
<i>Лисина О.Ю., Шарипов Р.Р., Московцев А.А., Сурин А.М.</i>	
Ингибирование NMDA-каналов ускоряет репарацию нейрональной сети при механическом повреждении первичной нейрональной культуры из мозжечка крысы	563
<i>Литвяков Н.В., Чойнзонов Е.Л.</i>	
Дедифференцировка нестволовых опухолевых клеток в стволовые как ключевой механизм перехода микрометастазов в макрометастазы	565
<i>Лихоманова Р.Б., Юдинцева Н.М., Оганесян Е.А., Фофанов Г.К., Нечаева А.С., Зиганшин Р.Х., Шевцов М.А.</i>	
Применение низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 для подавления миграции и инвазии первичных клеток глиобластомы	567
<i>Лупатов А.Ю., Сарыглар Р.Ю., Вахрушев И.В., Бурунова В.В., Вторушина В.В., Полтавцева Р.А., Кречетова Л.В., Бурменская О.В., Павлович С.В., Ярыгин К.Н., Сухих Г.Т.</i>	
Иммуномодулирующие свойства мезенхимных стромальных клеток	569
<i>Луус А.Л., Боброва М.М., Куликов П.П., Фадеева И.С., Сенотов А.С., Минайчева В.В., Тетерина А.Ю., Кобякова М.И., Кескинов А.А.</i>	
Гидрогели на основе коллагена для замещения мягких тканей	571

<i>Лыков А.П., Горячкин А.М., Долгалев Е.К., Повещенко О.В., Дровосеков М.Н.</i>	
Сравнительный анализ терапевтического потенциала рекомбинантного ангиогенина человека и кондиционированных сред соматических клеток при ожоге кожи у мышей	573
<i>Лыков А.П., Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., Уваров И.П., Суровцева М.А., Ким И.И., Повещенко О.В.</i>	
Влияние экстрактов микроводорослей и цианобактерий на пролиферацию соматических клеток человека <i>in vitro</i>	575
<i>Лыков А.П., Горячкин А.М., Долгалев Е.К., Повещенко О.В., Дровосеков М.Н.</i>	
Оценка влияния рекомбинантного ангиогенина человека на профиль цитокинов в сыворотке крови и экстрактах ткани ожоговой раны кожи у мышей CD-1	577
<i>Люблинская О.Г.</i>	
Генетически-кодируемые биосенсоры как инструмент для изучения редокс-метаболизма МСК	579
<i>Лядова И.В., Шевелева О.Н., Григорьева Е.В., Медведев С.П.</i>	
Генетически модифицированные iPSC: модель для изучения роли отдельных генов в регуляции дифференцировки и функции иммунокомпетентных клеток	581
<i>Лямина С.В., Иванова Т.И., Кожевникова Е.О., Калиш С.В., Слепов Ю.К.</i>	
Эффекты условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на изменения протеомных сигнатур и провоспалительный потенциал клеток	583
<i>Мадонов К.С., Балыкова Л.А., Бродовская Е.П., Власов А.П., Абелова А.А., Власова Т.И.</i>	
Оценка <i>in vitro</i> эффектов обогащённой тромбоцитами плазмы крови пациентов молодого и пожилого возраста	585
<i>Майорова В.Е., Моллаев М.Д., Вихрева П.Н., Кибардин А.В., Масчан М.А., Ларин С.С.</i>	
Последовательности натуральных лигандов в роли узнающего домена CAR, специфичных в отношении мембранных рецепторов ..	587
<i>Макаров М.С., Сторожева М.В., Пономарев И.Н., Боровкова Н.В., Буланов А.Ю.</i>	
Биологический потенциал аллогенных тромбоцитов, выделенных из цельной крови: перспективы использования в регенеративной медицине	589
<i>Макеева В.С., Малахова А.А., Дырхеева Н.С., Закиян С.М.</i>	
Влияние ингибиторов PARP1 на развитие патологических процессов в нейральных производных, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Хантингтона	591
<i>Макеев О.Г., Коротков А.В., Десяткова М.А., Антонова С.Б., Боковой В.Д.</i>	
Генотерапия atopического дерматита	593
<i>Макеев О.Г., Шуман Е.А., Коротков А.В., Десяткова М.А., Антонова С.Б.</i>	
Гель на основе компонентов стволовых клеток для терапии повреждений кожи	595
<i>Маклакова И.Ю., Капралов А.И., Гребнев Д.Ю., Базарный В.В., Полушина Л.Г.</i>	
Перспектива использования фукоксантина в качестве геропротектора	597
<i>Максимова А.А., Шевела Е.Я., Ращупкин И.М., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р.</i>	
Эффекты кондиционных сред макрофагов человека на дифференцировку и дедифференцировку легочных фибробластов	599
<i>Малахова А.А., Макеева В.С., Капитошина Е.В., Аллаярова Э.Р., Дырхеева Н.С., Григорьева Е.В., Медведев С.П., Лаврик О.И., Закиян С.М.</i>	
Клеточные модели нейродегенеративных заболеваний для изучения патологических процессов в нейронах при протеинопатиях ..	601
<i>Малыгина А.В., Михайлова Н.А., Красковская Н.А.</i>	
Создание лентивирусной конструкции для получения индуцированных дофаминергических нейронов методом прямого репрограммирования	603
<i>Мальцев С.А., Петракова Н.В., Зобкова Ю.О., Баранов О.В., Фомин А.С., Ашмарин А.А., Комлев В.С.</i>	
Кальций-фосфатный материал для замещения костных дефектов с возможностью люминесцентной диагностики	606
<i>Мамедова А.Р., Смольянинова Л.В., Колеина Г.С., Скрыбин Б.В., Аверина О.А., Попов В.С., Пермьяков О.А., Животовский Б.Д.</i>	
Физиологические и молекулярные эффекты инактивации каспазы-2 у млекопитающих	608
<i>Манжуло И.В., Манжуло О.С., Пономаренко А.И.</i>	
Синаптамид регулирует реактивный астроглиоз при черепно-мозговой травме у мышей	610
<i>Марей М.В., Манухова Л.А., Высоких М.Ю., Ребриков Д.В., Скулачев М.В.</i>	
Митохондриально-адресованное производное пластохинона attenuирует гибель фибробластов пациентов с синдромом Лея в модели индуцированного окислительного стресса <i>in vitro</i>	612
<i>Маркина Е.А., Бобылева П.И., Матвеева Д.К., Буравкова Л.Б.</i>	
Особенности процессов восстановления стромальных и гемопоэтических прогениторных клеток костномозговой ниши после воздействия ионизирующего излучения и токсических веществ	614

<i>Маркин А.М., Киселева Д.Г., Хованцева У.С., Чередниченко В.Р., Чакал Д.А., Брешенков Д.Г., Маркина Ю.В., Чарчян Э.Р.</i> Особенности функционирования клеточных популяций кровеносных сосудов как фундамент восстановления нормальной структуры ткани	616
<i>Мартиросян Я.О., Назаренко Т.А., Силачев Д.Н., Попов К.В.</i> Перспективы использования достижений регенеративной медицины в лечении женского бесплодия	619
<i>Марченко Л.Н., Чекина А.Ю., Джумова М.Ф., Бутько Л.В., Федулов А.С., Качан Т.В., Гузов С.А., Василевич И.Б., Матиевский К.А., Квачева З.Б., Волотовский И.Д.</i> Эффективность клеточной терапии при патологии роговицы	621
<i>Масленникова А.К.Ю., Червякова Я.В.</i> Разработка биомедицинских клеточных продуктов для генотерапии ВИЧ-инфекции	623
<i>Матвеева В.А., Чернышова Н.С., Тамкович С.Н., Селедцова Н.В., Артемьева Л.В., Морозов В.В.</i> Немного о секрете мезенхимальных стволовых клеток функционального слоя эндометрия пациенток с хроническим эндометритом	625
<i>Матвеев В.А., Одицова И.А., Русакова С.Э., Шеладев И.В.</i> Роль «фантомных» волокон в регенерации скелетной мышечной ткани после компрессионной травмы в эксперименте	627
<i>Матвейчук И.В., Розанов В.В.</i> Роль поверхностного слоя костного имплантата в оценке его структурно-функциональных и остеоинтегративных свойств	629
<i>Маясин Ю.П., Осинникова М.Н., Осадчая Д.В., Дмитриенко В.С., Ризванов А.А.</i> Разработка подхода по определению чувствительности клеток рака молочной железы к цисплатину на основе быстрого флуоресцентного окрашивания сфероидов зондами, специфичными для каспазы 3/7	631
<i>Мелконян К.И., Асякина А.С., Фоменко А.А., Солоп Е.А.</i> Влияние матриклеточного белка тенасцина-С на функциональную активность фибробластов кожи человека	633
<i>Мельник А.П., Дерябин П.И., Бородкина А.В.</i> Создание модели для изучения возраст-зависимых изменений стромальных клеток эндометрия	635
<i>Мельникова А.А., Гривцова Л.Ю.</i> Разработка оптимизированной схемы получения зрелых дендритных клеток из моноцитов периферической крови человека	637
<i>Мельникова Е.В.</i> Обеспечение качества препаратов клеточной терапии, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	639
<i>Мензоров А.Г., Минина Ю.М., Воинова В.Ю., Сафонова М.П., Лагарькова М.А., Воловиков Е.А., Пристяжнюк И.Е.</i> Новые линии ИПСК для моделирования синдрома Коэна	641
<i>Мензул В.А., Егоров Е.Е.</i> Лечение ран в собственной жидкой среде (по В.А. Мензулу)	643
<i>Меркулов М.В., Астрелина Т.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Завьялов А.О., Маливанова Т.Ф., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Бульчева Ю.И., Никитина В.А., Михадаркина О.Г., Дубова Е.А., Лишук С.В., Павлов К.А., Цимахович А.О., Серова О.Ф., Самойлов А.С.</i> Эффективность препарата гидрогеля при лечении радиационных поражений кожи у лабораторных животных	645
<i>Мжаванадзе Н.Д., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Щулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Назимова Е.Ю., Маркитан Г.С., Сеидкулиева А.А., Некрасова М.С.</i> Влияние биофлавоноидов на экспрессию маркера клеточной сенесценции в стенке подкожных вен при варикозной болезни <i>in vitro</i> ..	647
<i>Милутинович К.С., Собянин К.А., Попов В.С.</i> Недостаточность слизистой оболочки кишечника у мышей, нокаутных по гену <i>Muc2</i> , не гарантирует развитие хронического воспаления	649
<i>Минайчев В.В., Тетерина А.Ю., Кобякова М.И., Смирнов И.В., Смирнова П.В., Шлыков М.А., Салынкин П.С., Сенотов А.С., Михайлов Е.С., Пятин К.В., Фадеев Р.С., Баринов С.М., Комлев В.С., Фадеева И.С.</i> Остеоиммунологический ландшафт определяет биологическую совместимость кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом	651
<i>Миняева И.С., Синягина М.Н., Гарифулин Р.Р., Калямова А.В., Гайнуллин И.И., Агаев А.М., Сираева А.Р., Фадеев Ф.О., Измайлов А.А.</i> Биоинформатический анализ транскриптома генетически модифицированных лейкоцитов мини-свиней	653
<i>Миронова Е.С.</i> Пептидная регуляция направленной дифференцировки стволовых клеток	655
<i>Михайлова Н.А., Кольцова А.М., Хотин М.Г.</i> Российская коллекция типовых клеточных культур (RTCC) — биоресурсный центр для обеспечения фундаментальных и прикладных исследований в Российской Федерации	657

<i>Михайлов В.М., Фирсанов Ю.В., Фадеева С.Э., Веженкова И.В., Михайлова Е.В., Соколова А.В., Мамаева Г.И.</i>	
Влияние НАДФ на выживание клеток и репарацию ДНК кардиомицитов мышей mdx после термодинамического стресса	659
<i>Мичурина С.С., Стафеев Ю.С., Агарёва М.Ю., Белоглазова И.Б., Парфёнова Е.В.</i>	
Активация экспрессии креатинкиназы В и глицеролкиназы для создания термогенных адипоцитов	661
<i>Молдавский Д.В., Лузина Е.А., Кадырова А.С., Гилязиева З.Е., Ризванов А.А., Соловьева В.В.</i>	
Исследование влияния везикул мезенхимных стволовых клеток на ксенографтной модели опухоли молочной железы	663
<i>Молодцова Д.В., Осипов А.Н.</i>	
Мезенхимальные стволовые клетки и онкологические заболевания: за и против	665
<i>Монакова А.О., Басалова Н.А., Попов В.С., Мангушева В.А., Балабаньян В.Ю., Ефименко А.Ю.</i>	
Тканеспецифичность мезенхимных стромальных клеток в регуляции ниши сперматогонияльных стволовых клеток.	667
<i>Морозова К.Н., Вольф Е.Р., Смирнов А.В., Киселева Е.В., Пристяжнюк И.Е.</i>	
Ультраструктурные нарушения в клетках-производных НЕК293, несущих биаллельные мутации в гене <i>CON1</i> , ассоциированном с синдромом Коэна	669
<i>Морозова Я.В., Радаев С.М., Емелина Д.А.</i>	
Системное применение плазмы пуповинной крови человека у детей с расстройствами аутистического спектра (АСД) в сочетании с эпилепсией.	671
<i>Мусина Л.А., Назмутдинов Б.Р., Шангина О.Р., Лебедева А.И.</i>	
Применение аллогенного биоматериала для коррекции адьювантного артрита у крыс.	673
<i>Муслимова Э.Ф., Афанасьев С.А., Синенков М.А., Михеева Э.Р., Гришин А.С., Егунов О.А., Бощенко А.А.</i>	
Использование фибробластов для оценки биосовместимости полимерного материала из олигомеров метакрилового ряда	675
<i>Мухина И.В., Новикова А.А., Иванова В.О., Кирпичева А.С., Широкова О.М., Першин В.И.</i>	
Нейропротекторные свойства гидрогеля на основе децеллюляризованного внеклеточного матрикса в стратегии тканезаместительной терапии при травматических повреждениях головного мозга	677
<i>Надараина К.В., Пяткова М.А., Плешкова А.И., Белов Е.А., Имшинецкий И.М., Герасименко М.С., Манжуло И.В., Пономаренко А.И., Машталяр Д.В.</i>	
Биоактивные гибридные покрытия на имплантационных материалах, полученных аддитивными технологиями	679
<i>Назарова Е.А., Примакова Е.А., Сыманович А.А., Юркина Е.Г., Романова И.А., Дедюля Н.И., Ефимов Д.Ю., Садовский Д.Н., Киреева А.И., Кривенко С.И., Щерба А.Е., Руммо О.О.</i>	
Получение и характеристика децеллюляризованного матрикса печени	681
<i>Наместникова Д.Д., Черкашова Э.А., Гумин И.С., Губский Л.В., Ярыгин К.Н., Губский И.Л.</i>	
Морфометрический анализ МР-данных экспериментального инфаркта мозга на основе архитектуры Swin UNETR.	683
<i>Наместникова Д.Д., Черкашова Э.А., Губский И.Л., Коваленко Д.Б., Самойлова Е.М., Покусавца И.А., Сухинич К.К., Мельников П.А., Чехонин В.П., Баклаушев В.П.</i>	
Совместное введение нейральных прогениторных клеток и мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном ишемическом инсульте повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для клеток и эффективность клеточной терапии по сравнению с монотерапией.	685
<i>Насибов Т.Ф., Горохова А.В., Порохова Е.Д., Старосветская А.А., Бариев У.А., Носов В.Е., Казанцева Е.А., Акимова Е.Б., Комарова Е.Г.</i>	
Изучение остеогенной активности кальций-фосфатных покрытий с добавлением биodeградируемого гидрогеля, содержащего ванкомицин.	688
<i>Насыбуллина Э.И., Тимофеева А.В., Гарифуллина А.А., Ахметзянова Э.Р.</i>	
Динамические изменения концентрации цитокинов в сыворотке крыс в зависимости от степени повреждения и посттравматического периода травмы спинного мозга.	691
<i>Наумов В.Д., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И.</i>	
Разработка алгоритма подбора параметров модели человеческой сердечной ткани.	693
<i>Нащекина Ю.А., Чабина А.С., Консон В.А., Нащекин А.В., Михайлова Н.А.</i>	
Коллагеновые гели с разной степенью жесткости для задач тканевой инженерии	695
<i>Неганова И.Э., Гурский В.</i>	
Анализ индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с использованием методов глубокого обучения; перспектива выбора лучшего клона для целей регенеративной медицины.	697
<i>Низязева Н.В., Сухачева Т.В., Милованов А.П., Фокина Т.В., Пацаев Т.Д., Деев Р.В.</i>	
Многоядерные гигантские клетки трофобласта в миометрии пациенток при вращении плаценты	699

<i>Никитина Т.В., Карагяур М.Н., Потапова А.Ю., Макаревич П.И., Еремичев Р.Ю.</i>	
Создание иммортализованной линии мезенхимальных стромальных клеток эндометрия человека с гиперэкспрессией эстрогенового рецептора альфа	701
<i>Никишин Д.А.</i>	
Проблема исчерпаемости овариального резерва: биологические причины и методические подходы к решению	703
<i>Новикова А.А., Иванова В.О., Кирпичева А.С., Першин В.И., Мухина И.В.</i>	
Оценка функциональной активности гидрогеля на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса головного мозга свиньи в условиях <i>in vivo</i>	705
<i>Новикова В.Д., Вахрушев И.В., Басок Ю.Б., Баскаев К.К., Леонов Г.Е., Григорьев А.М., Белова А.Д., Кирсанова Л.А., Лупатов А.Ю., Бурунова В.В., Ковалёв А.В., Макаревич П.И., Севастьянов В.И., Ярыгин К.Н.</i>	
Выбор оптимального источника МСК для регенеративной терапии заболеваний суставного хряща	707
<i>Норкин Р.Р., Хусаинова Л.А., Яныгина Л.М., Ризванов А.А., Пономарев А.С.</i>	
Оценка эффективности и безопасности генетических подходов, направленных на восстановление уровня трансглутаминазы 1 <i>in vitro</i>	709
<i>Ныров В.А., Смирнова Д.В., Малашичева А.Б.</i>	
Влияние регуляции экспрессии ESRRa на остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения	711
<i>Оганесян Е.А., Лихоманова Р.Б., Фофанов Г.К., Шаматова М.М., Шевцов М.А., Юдинцева Н.М.</i>	
Оценка влияния тетродотоксина на клеточную подвижность в первичной культуре мультиформной глиобластомы человека	713
<i>Орлова П.А., Карягина А.С., Булыгина И.Н., Зайцева С.В., Пермьякова Е.С., Кудинова А.Г., Кудан Е.В., Даценко В.П., Жулина А.В., Грунина Т.М., Гришин А.В., Попонина М.С., Кривокубов М.С., Струкова Н.В., Сенатов Ф.С., Лукин В.Г., Громов А.В.</i>	
Бифункциональные имплантаты, включающие СВМПЭ, BMP-2 и лизоцифин: <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> характеристика	715
<i>Осидак Е.О., Андреев А.Ю., Домогатский С.П.</i>	
Искусственная роговица Viscoll: путь от лаборатории до первых клинических результатов	717
<i>Осинникова М.Н., Маясни Ю.П., Дмитриенко В.С., Осадчая Д.В., Ризванов А.А.</i>	
Исследование уровня экспрессии CD206, MMP9 и STAT3 в популяциях макрофагов, дифференцированных из мононуклеарных клеток периферической крови <i>in vitro</i>	719
<i>Осипов А.Н., Чигасова А.К., Осипов А.А., Игнатов М.А., Федотов Ю.А., Воробьева Н.Ю., Душенко М.В., Абдуллаев С.А.</i>	
Молекулярные и клеточные эффекты компьютерной томографии в мезенхимальных стволовых клетках человека	721
<i>Павлова Г.В., Шамадыхова Дж.В., Паршина В.В., Пантелеев Д.Ю., Ревущин А.В.</i>	
Разнообразие форм GDNF и их роль в дифференцировке прогениторных клеток ЦНС	723
<i>Павлова Г.В., Колесникова В.А., Пронин И.Н., Усачев Д.Ю., Копылов А.М.</i>	
Дифференцировочная терапия стволовых/прогениторных клеток глиомы головного мозга человека	725
<i>Павлова С.А., Фаб Л.В., Дзариева Ф.М., Копылов А.М., Павлова Г.В.</i>	
Комбинации аптамеров как новый подход к лечению глиобластом	727
<i>Павлова С.В., Шульгина А.Е., Закиян С.М., Дементьева Е.В.</i>	
Влияние генетических вариантов с неясным клиническим значением в генах саркомерных белков на развитие гипертрофической кардиомиопатии на модели кардиомиоцитов, дифференцированных из изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9	729
<i>Пак О.И., Косьянова А.А., Зайцев С.В., Брюховецкий И.С.</i>	
Антагонист рецептора CXCR4-плериксафор повышает эффективность иммунотерапии и улучшает выживаемость крыс с глиомой C6	732
<i>Паламарчук А.И., Стрельцова М.А.</i>	
Оверэкспрессия каталитической субъединицы теломеразы hTERT приводит к повышению уровня экспрессии PIK3CD NK-клеток	734
<i>Паншин Д.Д., Тарасов М.С., Смирнова Д.В., Енукашвили Н.И., Малашичева А.Б.</i>	
Вариабельная экспрессия RUNX2 и Notch оказывает влияние на уровни профибротических маркеров в активированных фибробластах легкого	736
<i>Пань Сяовень, Вишнякова Х.С., Ясько М.В., Егоров Е.Е.</i>	
Свободные жирные кислоты с длинной цепью стимулируют вторую волну роста волос у мышей C57Bl/6	738
<i>Пань Сяовень, Чегодаев Е.С., Вишнякова Х.С., Журавлев А.Д., Никифоров Н.Г., Егоров Е.Е.</i>	
Влияние свободных жирных кислот на продукцию цитокинов клетками человека	740
<i>Парамонов Б.А., Хоанг Х.Т., Парамонова Н.М., Юдинцева Н.М.</i>	
Микроаутодермопластика при лечении ожогов	742
<i>Парамонов Б.А., Парамонова Н.М.</i>	
К вопросу о возможной персистенции вируса COVID-19 в волосяных фолликулах	744

<i>Парфенова П.С., Красковская Н.А., Кольцова А.М., Шатрова А.Н., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.</i>	
Получение и характеристика линий дермальных фибробластов для моделирования болезни Хантингтона	746
<i>Первушин Н.В., Япрынцева М.А., Бадлаева А.С., Шипунова В.О., Маслова О.В., Нилов Д.К., Копейна Г.С., Животовский Б.Д.</i>	
Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с приобретенной устойчивостью к антагонистам Mcl-1 и MDM2	748
<i>Перепеченов С.С., Титова А.А., Тазетдинова Л.Г., Филатов Н.С., Билялов А.И., Киясов А.П., Гусев О.А.</i>	
Регенераторный потенциал <i>Acomys cahirinus</i> при исследовании травм скелетной мышечной ткани	750
<i>Переплетчикова Д.А., Басович Л.С., Кучур П.Д., Азаркина К.Е., Смирнова Д.В., Боярская Н.В., Карелкин В.В., Малашичева А.Б.</i>	
Сложное взаимодействие между эндотелиальными клетками и остеобластами во время остеогенной дифференцировки	752
<i>Перетягин П.В., Соловьева А.Г.</i>	
Особенности микроциркуляции крови под влиянием озона в оценке репаративных процессов на модели дорсального кожного лоскута крыс	754
<i>Першина О.В., Пахомова А.В., Рыбалкина О.Ю., Узянбаев И.А., Федорова Е.П., Сандрикина Л.А., Соколова Л.А., Жданов В.В.</i>	
Стволовые опухолевые клетки — маркеры развития рака легкого при легочном фиброзе в эксперименте	756
<i>Першин В.И., Кирпичева А.С., Новикова А.А., Широкова О.М., Мухина И.В.</i>	
Исследование морфофункциональных характеристик гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга минипига	758
<i>Петинати Н.А., Садовская А.В., Шипунова И.Н., Дорофеева А.И., Дризе Н.И., Васильева А.Н., Алешина О.А., Карасева Л.А., Покровская О.С., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н.</i>	
Влияние сыворотки крови больных острыми лейкозами на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки здоровых доноров	760
<i>Петракова Н.В., Зобкова Ю.О., Пенкина Т.Н., Комлев В.С., Свиридова И.К., Ахмедова С.А., Сергеева Н.С.</i>	
Медьсодержащие трикальцийфосфаты с антибактериальной активностью для замещения костных дефектов	762
<i>Петрова Е.С., Колос Е.А.</i>	
Изучение резидентных макрофагов эндоневрия седалищного нерва крысы	764
<i>Пикина А.С., Еремеев А.В.</i>	
Модельная система гематоэнцефалического барьера на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	766
<i>Писарева Е.В., Власов М.Ю., Волова Л.Т., Самойленко Ф.О.</i>	
Сорбционные свойства аллогенного минерального компонента кости	768
<i>Писарева Е.В., Волова Л.Т., Власов М.Ю.</i>	
Доклиническая оценка безопасности минерального компонента костной ткани <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	770
<i>Плешаков П.С., Белоусова Д.А., Филатов Н.А., Букатин А.С.</i>	
Микролуночная платформа для изолирования и длительного культивирования одиночных клеточных сфероидов, сформированных методами капельной микрофлюидики	772
<i>Плешкова А.И., Пяткова М.А., Надараца К.В., Машталяр Д.В., Синябрюхов С.Л., Гнеденков С.В.</i>	
Исследование остеогенеза и цитотоксичности бисфосфонат-содержащих покрытий	774
<i>Плотникова Е.А., Давлетшин Э.Ф., Сабиров Д.Х., Тимофеева А.В., Агеева Т.В., Мухамедшина Я.О.</i>	
Упражнения на беговой дорожке, дополненные терапией блокатора кальциевых каналов, стимулируют синтез нейтропротекторных молекул через JAK-STAT3	776
<i>Плотников Е.Ю., Абрамичева П.А., Андрианова Н.В., Буян М.И., Зорова Л.Д., Зоров Д.Б., Певзнер И.Б., Соколов И.А.</i>	
Участие стволовых клеток в повреждении и регенерации почки при старении и нефропатиях	777
<i>Подвысоцкая В.С., Григорьева Е.В., Медведев С.П., Закиян С.М.</i>	
Использование экзогенной сверхэкспрессии SOX6 для направленной дифференцировки пациент-специфичных ИПСК, несущих генетический вариант с.1087G>T (р. G363C) в гене <i>LGR4</i> , в дофаминергические нейроны	779
<i>Поденкова У.И., Кригер Д.В., Бахмет Е.И., Потапенко Е.В., Томилин А.Н., Цимоха А.С.</i>	
Выход эмбриональных стволовых клеток мыши из состояния наивной плюрипотентности сопровождается активацией иммунопротеасом	781
<i>Поздняков Д.Ю., Дерябин П.И., Бородкина А.В.</i>	
Влияние регулируемой кратковременной экспрессии факторов плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4 на свойства эндометриальных стромальных клеток человека	783
<i>Покровский Н.С., Водякова М.А., Мельникова Е.В.</i>	
Клеточная терапия: определение минимальных манипуляций	785

<i>Покусеева И.А., Наместникова Д.Д., Черкашова Э.А., Губский И.Л., Коваленко Д.Б., Самойлова Е.М., Сухинич К.К., Вахрушев И.В., Чехонин В.П., Ярыгин К.Н.</i>	
Сравнительная терапевтическая эффективность мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из разных источников, при внутриартериальной трансплантации в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс	787
<i>Полешко А.Г., Подгайский В.Н., Басалай В.М., Квачева З.Б., Пинчук С.В., Василевич И.Б., Тишук О.И., Мисюкевич А.Ю.</i>	
Опыт клинического применения коллагенового носителя при лечении дефектов костной ткани с использованием клеточных технологий	789
<i>Поликарпов Е.В., Козин С.В., Смолярчук Е.А., Сологова С.С., Еремеева К.В., Миронцев А.В., Шишмаков М.А., Бакаева З.В.</i>	
Разработка методики получения первичной культуры нейронов спирального ганглия с целью изучения регенеративных свойств нейритов и скрининга отопротективных свойств соединений	791
<i>Полтавцева Р.А., Воденникова А.А., Моисеева Е.В., Окара П.С., Бобкова Н.В., Чернышев В.С., Свирщевская Е.В.</i>	
Эффективность интраназального введения малых внеклеточных везикул на ориентировочно-исследовательское поведение и резистентность к стрессу у мышей разного возраста	793
<i>Полянская Г.Г.</i>	
Деятельность Коллекции культур клеток позвоночных, созданной профессором Г.П. Пинаевым	795
<i>Попик Е.А., Спасельникова А.В., Шарова Е.И., Скородумова Л.О., Канаева В.А., Лагарькова М.А., Богомазова А.Н., Лебедева О.С.</i>	
Экспрессия белков внеклеточного матрикса и десмосомы в ИПСК на ранних стадиях дифференцировки дофаминергических нейронов с заменой G2019S в LRRK2	797
<i>Попов В.С.</i>	
Проблемы использования трансгенных животных в исследованиях регенерации	799
<i>Попов К.В., Тризна Ю.А., Дружилловская О.С., Ребриков Д.В.</i>	
Опыт проектирования экспериментальных производственных площадок для выпуска высокотехнологичных лекарственных препаратов	801
<i>Посессор А.Д.</i>	
Сравнительная характеристика десны после применения коллагеновых матриксов и соединительнотканых трансплантатов в области дентальной имплантации	803
<i>Посыпанова Г.А., Осипов А.А., Журник А.С., Шапошникова Д.А., Кириченко С.В.</i>	
Радиочувствительность нейральных стволовых клеток	805
<i>Пресняков Е.В., Копылов Е.Д., Далгатов М.Г., Емелин А.М., Бозо И.Я., Деев Р.В.</i>	
Генная активация регенерации костной и соединительной тканей	807
<i>Примакова Е.А., Сыманович А.А., Назарова Е.А., Юркина Е.Г., Смольникова В.В., Романова И.А., Дедюля Н.И., Кривенко С.И.</i>	
Интерферон-гамма как потенциальный индуктор иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стромальных клеток	810
<i>Приходько Е.М., Юркевич Ю.В., Енукашвили Н.И., Супильникова Н.В., Багаева В.В., Семенова Н.Ю., Крышень К.Л., Тараскин А.О., Бородин А.Ю.</i>	
Препарат на основе дермальных фибробластов для поверхностного нанесения: экспериментальная оценка биобезопасности	812
<i>Приходько Е.М., Супильникова О.В., Масленникова И.И., Енукашвили Н.И., Котова А.В., Багаева В.В., Золина Т.Л., Конкина А.И., Яцемирский Г.С.</i>	
Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий «Покровский»	814
<i>Прокудина Е.С., Сенокосова Е.А., Антонова Л.В., Кочергин Н.А.</i>	
Фиброин шёлка — основа биополимерной сосудистой заплаты: результаты преclinical испытаний	816
<i>Пронина А.С., Суворова Г.Н.</i>	
Регенерация мышечной ткани внутреннего сфинктера прямой кишки на фоне экспериментального мужского гипогонадизма	818
<i>Пуленова М.М., Кирсова Д.П., Мызина М.С., Смирнова О.А., Липатова А.В., Калинин А.А., Баклаушев В.П., Юсубалиева Г.М.</i>	
Доставка таргетных белков в глиомные клетки с помощью рекомбинантных штаммов LIVP	820
<i>Пшеничникова О.С., Селиванова Д.С., Зозуля Н.И., Сурин В.Л.</i>	
Выбор потенциальных мишеней для генной терапии наследственного дефицита фактора свертывания крови FVII в российской популяции	822
<i>Пыхтина П.А., Кобзев М.В., Хабекирова С.А.</i>	
Возможность применения В-дефензина в регенеративной биомедицине в комбинации с секретомом МСК	824
<i>Пятина К.В., Звягина А.И., Минайчев В.В., Кобякова М.И., Смирнов И.В., Смирнова П.В., Тетерина А.Ю., Фадеева И.С.</i>	
Импрегнированные кальций-фосфатными соединениями коллагеновые мембраны: новый подход создания барьерных мембран с остеоиндуктивными свойствами для направленной регенерации костной ткани	826

<i>Пяткова М.А., Плешкова А.И., Надараша К.В., Пономаренко А.И., Манжуло И.В., Герасименко М.С., Белов Е.А., Осьмушко И.С., Имшенецкий И.М., Машталар Д.В.</i>	
Биоактивные свойства гибридных покрытий с менахиноном-7, полидофамином, золедронатом и ванкомицином для костных имплантатов	829
<i>Раднаева А.В., Кудряшова Е.В., Злотников И.Д., Еремичев Р.Ю., Слободкина Е.А., Макаревич П.И.</i>	
Изучение генотерапевтической конструкции на основе плазмидной ДНК и поликатионных соединений для увеличения эффективности трансфекции <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	831
<i>Ратушняк М.Г., Родина А.В., Губани Д.Ф., Шапошникова Д.А., Москалева Е.Ю.</i>	
Повышение выживаемости облученных НСК с помощью экзосом стволовых клеток и особенности их накопления в разных клетках головного мозга	833
<i>Ревакатова Д.П., Бикмулина П.Ю., Файзуллин А.Л., Христидис Я.И., Корнеев А.А., Кошелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С.</i>	
Разработка биоэквивалента на основе внеклеточных везикул и сфероидов для восстановления незаживающих ран	835
<i>Ремезова А.Н., Орлова Н.В., Муравьев А.Н., Ариэль Б.М., Виноградова Т.И., Юдинцева Н.М., Иванова Я.Г., Горбунов А.И.</i>	
Экспериментальное применение мезенхимных клеток и внеклеточных везикул в комплексной терапии туберкулеза почки кролика	837
<i>Ржанова Л.А., Александрова М.А.</i>	
Стволовые клетки ретинального пигментного эпителия глаза человека и млекопитающих	839
<i>Ржепаковский И.В., Писков С.И., Аванесян С.С., Сизоненко М.Н., Кочергин С.Г., Тимченко Л.Д.</i>	
Биосовместимость 3D-скаффолдов на основе различных полисахаридов	841
<i>Ризванов А.А., Муллагулова А.И., Шаймарданова А.А., Соловьева В.В., Мухамедшина Я.О.</i>	
Генная терапия лизосомных болезней накопления	843
<i>Риппинен Д.В., Соловьева А.О.</i>	
Скрининг чувствительности фибробластоподобных синовиоцитов, полученных от больных ревматоидным артритом, к ФНО-А как основному игроку в патогенезе	845
<i>Риппинен Д.В., Соловьева И.М., Овчинников В.С., Ярославцев Д.В., Соловьева А.О.</i>	
Нетканые материалы с антибактериальными свойствами на основе поликапролактона	847
<i>Роговая О.С., Черкашина О.Л., Аболин Д.С., Воротеляк Е.А., Калабушева Е.П.</i>	
Оценка антифибротических свойств вертепорфина в составе коллагенового носителя в модельной ране	849
<i>Родимова С.А., Елагин В.В., Можеров А.М., Щечкин И.Д., Крылов Д.П., Козлов Д.С., Гаврина А.И., Бобров Н.В., Загайнов В.Е., Загайнова Е.В., Кузнецова Д.С.</i>	
Новые оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при патологии	851
<i>Романишин А.О., Васильев А.А., Хасаншин Э.М., Евтехов А.А., Какоткин В.В., Агапов М.А., Семина Е.В.</i>	
Онколитические вирусы как новый подход терапии глиом	853
<i>Романова О.А., Кляйн О.И., Сытина Е.В., Тенчурич Т.Х., Пацаев Т.Д., Чвалун С.Н., Пантелеев А.А.</i>	
Потенциал нетканых матриц в биоинженерии трахеального эпителия	855
<i>Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Ткачук В.А.</i>	
Участие Т-кадгерина в регуляции обновления и дифференцировки МСК жировой ткани	857
<i>Русинова Т.В., Асякина А.С., Солоп Е.А.</i>	
Морфологическая оценка эффективности регенерации нерва после имплантации биосинтетического кондуита	859
<i>Ручко Е.С., Голубинская П.А., Пикина А.С., Смирнов И.П., Гордеева В.Д., Арапиди Г.П., Еремеев А.В.</i>	
Пролиферативная активность и профили экспрессии генов 2D- и 3D-культур хондроцитов различного генеза	861
<i>Рябинин А.А., Панкратова М.Д., Калабушева Е.П., Старинов З.Р., Сабиров М.С., Чикина Е.А., Воротеляк Е.А., Васильев А.В.</i>	
YAP/TAZ сигналинг в развитии кожи человека на модели дифференцировки эмбрионидных телец из ЧИПСК в кожные органоиды	863
<i>Рябов В.М., Тяпкин Н.И., Гужова И.В.</i>	
Органоиды из опухолевой и нормальной тканей простаты как модель для тестирования противораковых препаратов энзалутамид и абиратерон	865
<i>Сабирова С.В., Сырмаятникова В.Ю., Ханнанов А.А., Гомзикова М.О.</i>	
Сравнительный анализ выхода внеклеточных и индуцированных микровезикул методом NTA	867
<i>Сабиров Д.Х., Давлетшин Э.Ф., Тимофеева А.В., Агеева Т.В., Мухамедшина Я.О.</i>	
Влияние двигательной реабилитации на структурные и молекулярные изменения в спинном мозге при травме спинного мозга крысы	869
<i>Савельев Р.В., Скупневский С.В., Чехова А.М., Танделова А.В., Морозова Я.В.</i>	
Оценка профилактического действия мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека в модели адьювант-индуцированного ревматоидного артрита у крыс	871

<i>Савченкова И.П.</i>	
Мышечные эмбриональные стволовые клетки, чувствительные к вирусу инфекционной анемии лошадей	872
<i>Савченкова И.П.</i>	
Стволовые клетки животных — перспективный материал для развития коллекции культур клеток	874
<i>Садовская А.В., Петинати Н.А., Дризе Н.И., Васильева А.Н., Алешина О.А., Паровичникова Е.Н.</i>	
Нарушения метаболизма в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках костного мозга больных острыми лейкозами в дебюте заболевания и по мере лечения	876
<i>Салова А.В., Беляева Т.Н., Литвинов И.К., Корнилова Е.С.</i>	
Влияние закисления на динамику эндцитоза рецептора ЭФР в мезенхимных стромальных клетках человека	878
<i>Самойлова Е.М., Дашинамаев Э.Б., Снежкина А.В., Кудряшова О.М., Кондратьев Н.В., Баклаушев В.П.</i>	
Инициальные механизмы, определяющие эффективность прямого репрограммирования соматических клеток в пронейрональном направлении (по данным RNAseq)	880
<i>Сарыглар Р.Ю., Лупатов А.Ю., Ярыгин К.Н.</i>	
Иммunosuppressивное действие МСК из микроокружения солидных опухолей на клетки адаптивного иммунитета	882
<i>Сафарова Д.Д., Смирнова Д.В., Переплетчикова Д.А., Карагюр М.Н., Малашичева А.Б.</i>	
Иммортализация гингивальных фибробластов человека: получение стабильных клеточных линий	884
<i>Сафарян С.М., Нифонтова Г.О., Ефремов Ю.М., Зубанова Е.М., Голубева Е.Н., Костюк С.В., Березяно И.А., Шпичка А.И., Тимашев П.С.</i>	
Дизайн и характеристика раневых покрытий на основе термочувствительных полимерных наногелей	886
<i>Сахенберг Е.И., Красковская Н.А., Шатрова А.Н., Ярцева Н.М., Михайлова Н.А., Хотин М.Г.</i>	
Получение и характеристика клеточных линий дермальных фибробластов человека от доноров пожилого возраста	888
<i>Светозаров А.С., Абрамович Р.А., Потанина О.Г., Шарутин И.В., Воробьев А.Н.</i>	
Изготовление пеллет кофеина методом экструзии-сферонизации для фенотипирования цитохрома P450	890
<i>Сдобникова С.В., Махотин С.С., Овсепян А.А.</i>	
Возможность формирования артерий <i>de novo</i> в заднем отделе глаза при пролиферативной диабетической ретинопатии	892
<i>Сдобникова С.В., Махотин С.С., Овсепян А.А.</i>	
Взаимодействие глиальных клеток и новообразованных сосудов в экстраретинальной ткани при пролиферативной диабетической ретинопатии	894
<i>Селезнева А.В., Сергеев Н.А., Суздальцева Ю.Г.</i>	
Активация сигнальных путей WNT/В-катенина и BMP инициирует дифференциацию ИПСК человека в латеральные и параксиальные мезодермальные предшественники МСК <i>in vitro</i>	896
<i>Семенова П.И., Панова А.В., Сопова Ю.В., Гусев К.О., Краснова О.А., Ковалева А.А., Неганова И.Э.</i>	
Изменение функциональной активности иМСК при остеогенной дифференцировке после редактирования пациент-специфической линии клеток ИПСК с мутацией в гене <i>CaSR</i>	898
<i>Семидетнов И.С., Алхатиб Р., Романова С.А., Слотвицкий М.М., Цвеляя В.А., Агладзе К.И.</i>	
Оптический контроль динамики межклеточного кальция в индуцированных кардиомиоцитах, полученных из плюрипотентных стволовых клеток, с гипертрофической кардиомиопатией	900
<i>Семкина А.С., Загоскин Ю.Д., Кузнецов Н.М., Крупнин А.Е., Чвалун С.Н.</i>	
Гидрогели на основе тройных блок-сополимеров ПЛА-ПЭГ-ПЛА для тканевой инженерии: реологические свойства и 3D-печать	902
<i>Сенковенко А.М., Голубчиков Д.О., Котенева П.И., Бикмулина П.Ю., Тимашев П.С.</i>	
Оценка свойств фотоотверждаемых биочернил с клеточными сфероидными для трехмерной биопечати	904
<i>Сербина О.О., Киселева Е.В.</i>	
Активация эндотелиальных клеток миобластами с фенотипом ЛЛПМД как один из клеточных механизмов развития патологии. . .	906
<i>Сергеева Т.О.</i>	
Исследование регенеративных процессов в сердечной ткани	908
<i>Сергеев Н.А., Селезнева А.В., Суздальцева Ю.Г.</i>	
Функциональная активность клеток ранней мезодермы, дифференцированных из ИПСК человека, в ответ на стимуляцию IFN-Г и TNF-А	910
<i>Сережникова Н.Б., Файзуллин А.Л., Тимакова А.А., Иванова Е.И., Ершов Б.П., Файзуллина Н.М., Уласов И.В., Малоголовкин А.С., Котова С.Л., Тимашев П.С.</i>	
Перспективы периимплантационного таргетирования с использованием модифицированных аденовирусных векторов в регенеративной медицине	912

<i>Сигарева Л.П., Михайлова Е.В., Кромский С.В., Александров В.Н., Насыров Р.А.</i>	
Экспериментальная терапия аутоиммунного гломерулонефрита с применением внеклеточных везикул от культивирования мезенхимных мультипотентных стромальных клеток	914
<i>Силачев Д.Н., Горюнов К.В.</i>	
Нейропротекторные факторы внеклеточных везикул мезенхимальных стромальных клеток: от молекул к механизмам действия ...	916
<i>Сироткина М.Ю., Иноземцева А.В., Нащекин А.В., Нащекина Ю.А.</i>	
Исследование коллагеновых матриц, полученных при различных условиях фибриллообразования	919
<i>Смажило К.Ю., Усачёв В.А., Волошин Н.С., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Воронцова М.В.</i>	
Участие паракринных факторов в синхронизации ответа культуры МСК на ПТГ	921
<i>Смирнова Д.В., Ныров В.А., Сафарова Д.Д., Малашичева А.Б.</i>	
Роль фактора механотрансдукции KLF4 в поддержании функциональных свойств эндотелиальных клеток	923
<i>Смирнова П.В., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Баринов С.М., Комлев В.С.</i>	
Низкотемпературные покрытия на основе фосфатов кальция с альбумином на деминерализованном костном матриксе для выраженной физиологической биоминерализации	925
<i>Смольянинова Л.В., Мамедова А.Р., Каримова О., Скрыбин Б.В., Аверина О.А., Попов В.С., Шилова А.А., Животовский Б.Д., Копейна Г.С.</i>	
Каспаза-2 нокаутные мыши проявляют фенотип со сниженной репродуктивной функцией.	927
<i>Соколова А.В., Кунеев И.К., Нащекина Ю.А., Михайлов В.М., Домнина А.П.</i>	
Разработка метода 3D-культивирования гладкомышечных клеток миометрия с использованием целлюлозной матрицы растительного происхождения	929
<i>Соловьёв Д.А., Лапина Е.С., Александрова С.А., Чернета А.Е., Горбач В.И., Кравченко А.О., Ермак И.М., Блинова М.И., Александер-Синклер Э.И.</i>	
<i>In vitro</i> скрининг потенциальных липосомальных систем доставки эхинохрома и ацикловира.	931
<i>Соловьева Е.В., Кляйн О.И., Чайковская Е.А., Пантелеев А.А.</i>	
Оценка ранозаживляющей способности природоподобных самоорганизующихся скаффолдов на ксенотрансплантатах кожного лоскута человека	933
<i>Солопов М.В., Чечехина Е.С., Кавелина А.С., Аюбян Г.В., Турчин В.В., Попандоупло А.Г.</i>	
Сегментация микрофотографий мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с использованием нейросетевых алгоритмов. .	935
<i>Сорогина Д.А., Погосова М.А., Блохин М.Е., Хвостов М.В., Павлова С.В., Лузина О.А., Медведев С.П., Закиян С.М.</i>	
Создание тест-системы для оценки специфичности агонистов экспериментальных лигандов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR) <i>in vitro</i>	937
<i>Сорокина Л.Е., Красный А.М.</i>	
Регуляция цитотоксичности моноцитов: от отторжения аллотрансплантатов до лечения рака	939
<i>Спасельникова А.В., Попик Е.А., Копылова И.В., Казакова А.Н., Скородумова Л.О., Шендер В.О., Арапиди Г.П., Лагарькова М.А., Богомазова А.Н., Лебедева О.С.</i>	
Новые потенциальные мишени LRRK2 — белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами.	941
<i>Сперанская Е.М., Голубцова Н.Н., Скворцова Е.В., Москвичев Е.В., Москвичев В.В., Фахрутдинова К.Ф.</i>	
Особенности межклеточных взаимодействий клеток эпителия десны человека при пародонтите.	943
<i>Спирина Л.В., Зиннурова А.Б., Бакина О.В., Воробьев К.П.</i>	
Биохимические особенности воздействия холодной плазмы на фибробласты человека.	945
<i>Старкова Т.Ю., Синенко С.А., Томилин А.Н.</i>	
Роль негистонового белка HmgB1 в метаболизме эмбриональных стволовых клеток мыши	947
<i>Степанова О.В., Фурса Г.А., Чадин А.В., Воронова А.Д., Карсунцева Е.К., Андреева С.С., Шишкина В.С., Степаненко А.А., Решетов И.В., Чехонин В.П.</i>	
Трансплантация генно-клеточных конструкторов на основе клеток обонятельной выстилки, экспрессирующих нейротрофические факторы, как новая стратегия лечения пациентов с кистами спинного мозга.	949
<i>Степанов П.С., Седуш Н.Г., Крупнин А.Е., Алексанян М.М., Аганесов А.Г., Чвалун С.Н.</i>	
Влияние механической нагрузки на гидролитическую деградацию межтелового кейджа из полилактида	951
<i>Стрельникова Е.А., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Абаленихина Ю.В., Никифоров А.А., Никифорова Л.В., Поваров В.О., Суров И.Ю., Калинина А.Р.</i>	
Особенности митохондриальной активности первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов при моделировании нитрозативного стресса <i>in vitro</i>	953
<i>Стрельцова М.А., Деев С.М., Коваленко Е.И.</i>	
Генетическая модификация NK-клеток модульным CAR для лечения HER2-позитивного рака молочной железы	955

<i>Суббот А.М., Емец Е.В., Сафонова Т.Н., Зайцева Г.В.</i>	
Опыт 3D-культивирования клеток слезной железы человека	957
<i>Суров И.Ю., Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Стрельникова Е.А., Никифорова Л.В., Никифоров А.А., Поваров В.О., Захаров А.С., Калинина А.Р.</i>	
Изменения метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики <i>in vitro</i>	959
<i>Суровцева М.А., Ким И.И., Бондаренко Н.А., Краснер К.Ю., Чепелева Е.В., Бгатовая Н.П., Трунов А.Н., Черных В.В., Повещенко О.В.</i>	
Стромальные клетки, выделенные из лентикул после операции ReLEx SMILE, восстанавливают прозрачность роговицы мышей после травмы	961
<i>Сухоруков А.А.</i>	
Основные технологические примеси при производстве препаратов аденоассоциированных вирусных векторов	963
<i>Сыманович А.А., Примакова Е.А., Назарова Е.А., Ефимов Д.Ю., Юркина Е.Г., Дедюля Н.И., Садовский Д.Н., Романова И.А., Марчук А.Г., Шерба А.Е., Кривенко С.И., Руммо О.О.</i>	
Применение гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток пуповинно-плацентарного комплекса в терапии цирроза трансплантата печени: описание клинического случая	965
<i>Тенчурин Т.Х., Шепелев А.Д., Мамагулашвили В.Г., Сытина Е.В., Соловьева Е.В., Сидорук К.В., Малахов С.Н., Несмелов А.А., Шариков Р.В., Пантелеев А.А., Чвалун С.Н.</i>	
Трехмерные клеточные каркасы на основе фиброина шелка и коллагена для регенеративной медицины	967
<i>Тимофеева А.В., Ахметзянова Э.Р.</i>	
Исследование микроглиальной активации инфламмосомы NLRP3 при травме спинного мозга <i>in vivo</i>	969
<i>Тимченко Р.М., Пантелеев М.А.</i>	
Математическая модель внутреннего пути апоптоза фибробластов	971
<i>Тихонова Н.Б., Темнов А.А., Алексанкина В.В., Алексанкин А.П., Фокина Т.В., Склифас А.Н., Милованов А.П.</i>	
Особенности заживления матки крысы под воздействием умеренно гипоксической кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток	972
<i>Тихонова Н.Б., Степанова И.И., Гусарова Т.А., Степанов А.А., Михалева Л.М., Низяева Н.В.</i>	
Значение внеклеточных нейтрофильных ловушек при репродуктивных потерях	974
<i>Ткачев С.Ю., Чепелова Н.К., Галечян Г.Ю., Ершов Б.П., Голуб Д.А., Попова Е.О., Антошин А.А., Гилязова А.Н., Волошин С.Ю., Ефремов Ю.М., Истранова Е.В., Тимашев П.С.</i>	
Новый подход к визуализации клеточных культур в коллагеновых скаффолдах в водной среде с помощью рентгеновской микротомографии	976
<i>Товпеко Д.В., Кондратенко А.А., Калюжная Л.И.</i>	
Оценка структурных и функциональных свойств децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека как перспективного материала для регенеративной медицины	978
<i>Толстолужинская А.Е., Карагяур М.Н., Басалова Н.А., Дьячкова У.Д., Виговский М.А., Ефименко А.Ю.</i>	
Получение линий фибробластов человека с модулируемой экспрессией гена белка активации фибробластов α (FAP α)	980
<i>Торопов А.Л., Дерябин П.И., Бородкина А.В.</i>	
Развитие рака эндометрия ассоциировано с появлением субпопуляции сенесцентных клеток с иммуномодулирующей активностью ...	982
<i>Трубкина Е.И., Болдырева М.А., Агарева М.Ю., Мичурина С.С., Стафеев Ю.С., Парфёнова Е.В.</i>	
Смещение баланса дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток <i>Acotus sp.</i> в остеогенном направлении	984
<i>Турчанинова Е.А., Аитова А.А., Романова С.А., Коваленко С.Г., Цвеляя В.А., Слотвицкий М.М., Агладзе К.И.</i>	
Разработка новых протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты с помощью биоинформатического прогнозирования сигнальных путей	986
<i>Тюмина О.В., Давыдкин И.Л., Гриценко Т.А., Овчинников П.А.</i>	
Оценка безопасности и эффективности трансфузии аллогенной пуповинной крови пациентам с онкогематологическими заболеваниями	988
<i>Тюрин-Кузьмин П.А., Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю., Ткачук В.А.</i>	
Выбор направления и определение траектории дифференцировки постнатальных стволовых клеток	990
<i>Усакин Л.А., Максимова Н.В., Пантелеев А.А.</i>	
Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7903146 в гене <i>TCF7L2</i> с синдромом диабетической стопы	992
<i>Усанова А.П., Гилязова А.Н., Волошин С.Ю., Антошин А.А., Демура Т.А., Тимашев П.С.</i>	
Применение лактоферрин-содержащих коллагеновых матриц для регенерации кожных покровов	994

<i>Усатова В.С., Мишина Н.М., Берестовой М.А., Иваненко А.В., Джэппи Д., Круть В.Г., Соколов Р.А., Мощенко А.А., Розов А.В., Шевченко Е.К., Белоусов В.В.</i>	
Нейральные сфероиды в исследовании ишемии-реперфузии.	996
<i>Усачёв В.А., Кулебякин К.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А., Волошин Н.С., Зубарев И.В., Николаев М.Ю., Воронцова М.В.</i>	
Ключевая роль аденилатциклазы 1 в регулировании дифференцировочного потенциала МСК.	998
<i>Усупжанова Д.Ю., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Маливанова Т.Ф., Булычева Ю.И., Брунчуков В.А., Никитина В.А., Михадаркина О.Г., Цимахович А.О., Серова О.Ф., Самойлов А.С.</i>	
Оптимизация свойств гидрогеля из внеклеточного матрикса тканей человека для задач регенеративной персонифицированной медицины.	1000
<i>Ушаков Р.Е., Ратушный А.Ю., Буравкова Л.Б., Бурова Е.Б.</i>	
Децеллюляризованный внеклеточный матрикс усиливает паракринную функцию мезенхимных стромальных/стволовых клеток и улучшает их терапевтические свойства.	1002
<i>Фазуллин М.Ш., Караманян О.В., Ким С.С., Муллина Р.Р., Бекмухамедова Э.Э., Таргачев С.С., Шевченко Р.В., Маркосян В.А.4</i>	
Экспрессия трансгена в иммунокомпетентных органах мини-свиней после прямой и клеточно-опосредованной доставки с помощью химерного аденовирусного вектора.	1004
<i>Файзуллин А.Л., Иванова Е.И., Сережникова Н.Б., Тимашев П.С.</i>	
Топография поверхности PLA имплантата определяет исход тканевого ответа.	1006
<i>Файзуллин А.Л.</i>	
Научное наследие профессора А.Б. Шехтера в регенеративной медицине.	1008
<i>Фатыйхов И.Р., Кошеверова В.В., Каменцева Р.С., Харченко М.В., Котов М.А., Кунеев И.К., Карнилова Е.С.</i>	
ЭФР и ТФР-а препятствуют децидуализации эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, но не амфигулин. ...	1010
<i>Федорова Е.А., Рыжов А.П., Кнотко А.В., Фадеева И.В., Антонова О.С., Селезнева И.И.</i>	
Матрицы в регенеративной медицине на основе пористой керамики из двойных замещенных гидроксипатитов, допированных ионами марганца и стронция.	1012
<i>Федоров В.С., Колесниченко Ю.В., Лихоманова Р.Б., Юдинцева Н.М., Оганесян Е.А., Нечаева А.С., Аксенов Н.Д., Зиганшин Р.Х., Шевцов М.А.</i>	
Организация интерактома HSP70 в стволовых клетках мультиформной глиобластомы.	1014
<i>Федотов М.А.</i>	
Антидиабетическая активность коллоидного раствора селена.	1016
<i>Финк М.А., Бобыльков В.А., Александрова С.А., Дарвиш Д.М.</i>	
Разработка биоматериала на основе ксеноперикарда с улучшенными механическими свойствами и низкой цитотоксичностью. ...	1018
<i>Фомина Е.Г., Григорьева Е.Е., Корень С.В., Зверко В.В.</i>	
Идентификация культур клеток животного происхождения на основании ДНК-баркодирования участка гена субъединицы 1 цитохром с-оксидазы: алгоритм и результаты применения.	1020
<i>Фомина Ю.С., Загоскин Ю.Д., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н.</i>	
Гидрогелевые материалы на основе биоразлагаемых сополимеров для регенеративной медицины.	1022
<i>Форысенкова А.А., Фадеева И.В., Луценко И.А., Кошенкова К.А.</i>	
Гранулы из альгината натрия и поливинилпирролидона для локальной доставки антибактериальных препаратов к пораженным участкам мягких тканей.	1024
<i>Фотина А.С., Томилин А.Н., Кузьмин А.А.</i>	
Создание генно-инженерной платформы для направленного программирования клеток.	1026
<i>Фофанов Г.К., Лихоманова Р.Б., Юдинцева Н.М., Бобков Д.Е., Шевцов М.А.</i>	
Исследование миграционных характеристик высокоинвазивной субпопуляции клеток глиомы крысы С6.	1028
<i>Фурса Г.А., Чадин А.В., Карсунцева Е.К., Воронова А.Д., Шишкина В.С., Лазарева П.А., Степаненко А.А., Решетов И.В., Степанова О.В., Чехонин В.П.</i>	
Применение клеток обонятельной выстилки в фибриновых гидрогелях для терапии кист спинного мозга.	1030
<i>Хабарова А.А., Ян А.П., Сальников П.А., Гридина М.М., Кокшарова Г.С., Фишман В.С.</i>	
Использование системы CRISPR/Cas 9 при создании ИПСК модели для изучения роли структурных вариантов локуса AUTS2 в развитии нейродегенеративных заболеваний.	1032
<i>Хабекирова С.А., Пыхтина П.А., Кобзев М.В.</i>	
Цитотоксический эффект В-дефензина на линейные культуры фибробластов.	1034
<i>Халиуллин М.Р.</i>	
Généra — о генеративной медицине.	1036

<i>Хандохин М.М., Лобанова М.А., Слободкина Е.А., Макаревич П.И., Еремичев Р.Ю.</i>	
Строма роговицы демонстрирует внутреннюю способность к регенерации после щелочного ожога, несмотря на временное формирование миофибробластов	1038
<i>Ханова М.Ю., Матвеева В.Г., Антонова Л.В.</i>	
Персонализированный клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра: итоги экспериментального исследования.	1040
<i>Харченко М.В., Каменцева Р.С., Кошеверова В.В., Корнилова Е.С.</i>	
Экспрессия и секреция лиганда рецептора эпидермального фактора роста амфигреулина в мезенхимных стромальных клетках человека	1042
<i>Хисматуллина З.Р., Мусина Л.А., Гайнетдинов Р.Р.</i>	
Сетчатка крыс DAT-KO как новая экспериментальная модель ретинопатий.	1044
<i>Хмелевская С.А.</i>	
Этические и правовые проблемы проведения исследований и терапии индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК).	1046
<i>Хоанг Х.Т., Парамонов Б.А., Чмырёв И.В., Козьяев В.А., Савинков И.Ю.</i>	
Возможности применения трековых мембран после ранней некрэктомии глубоких ожогов кожи	1048
<i>Холоденко И.В., Ким Я.С., Сарыглар Р.Ю., Лупатов А.Ю., Холоденко Р.В., Малов С.Л., Багмет Н.Н., Манукян Г.В., Ярыгин К.Н.</i>	
Эфферцитоз апоптотических МСК как механизм иммуномодуляции	1050
<i>Хотин М.Г., Горячая Т.С., Шатрова А.Н., Михайлова Н.А.</i>	
Платформа для разработки и производства клеточных линий биомедицинского назначения	1052
<i>Храмцова Е.А., Петронюк Ю.С., Антипова К.Г., Азиева А.М., Пацаев Т.Д., Григорьев Т.Е.</i>	
Анализ изменения упругих свойств, объемной микроструктуры и геометрии нетканых матриксов на основе полилактида.	1054
<i>Хусаинова Л.А., Норкин Р.Р., Яныгина Л.М., Пономарев А.С., Ризванов А.А.</i>	
Сравнительная характеристика базальных и дифференцированных кератиноцитов и первичных человеческих фибробластов по эпидермальным маркерам.	1056
<i>Хуцистова А.О., Розанов В.В., Матвейчук И.В., Черняев А.П.</i>	
Актуальные научные исследования в области радиационной стерилизации костных имплантатов	1058
<i>Цвеляя В.А., Бережной А.К., Синицына А.П., Семидетнов И.С., Наумов В.Д., Слотвицкий М.М.</i>	
Моделирование диагностических платформ с помощью совмещенных <i>in silico</i> методов и тканевой инженерии сердца	1061
<i>Цеомашко Н.Е., Абидова А.Д.</i>	
Новые композиции на основе коллагена и растительных добавок для регенеративной и заместительной медицины	1062
<i>Цеомашко Н.Е., Хашимова З.С., Азимова Ш.С.</i>	
Применение культур клеток для поиска безопасных пролифераторов для регенеративной медицины и косметологии	1064
<i>Цибульников С.В.</i>	
Разработка микробного компонента для создания релевантных моделей кожи-на-чипе <i>in vitro</i>	1066
<i>Цимоха А.С., Кузнецов А.В., Зубарев И.В., Газизова А.Р., Селенина А.В., Пономарцев С.В., Томилин А.Н.</i>	
Эффективность клеточного репрограммирования определяется активностью иммунопротеасом.	1067
<i>Цховребова Л.В., Богомазова А.Н.</i>	
FISH с олигонуклеотидной пробой, специфичной для AluY-повторов, обеспечивает дифференциальное окрашивание хромосом высокого разрешения у <i>Macaca mulatta</i>	1069
<i>Чабина А.С., Середкина П.С., Богданова Д.Н., Кригер Д.В., Нащекин А.В., Курдюков Д.А., Просалов Н.Д., Нащекина Ю.А.</i>	
Модификация матриц на основе полиэфилов диаминами для задач тканевой инженерии	1071
<i>Чайлахян Р.К., Грошева А.Г., Воробьева Н.Н., Юсупов В.И., Свиридов А.П.</i>	
Стимуляция мезенхимных стволовых клеток костного мозга лазерным излучением	1073
<i>Чарушина Ю.А., Логинова Н.П., Заморина С.А., Раев М.Б.</i>	
Влияние пептидов ТБГ на формирование Т-хелперного ответа 17 типа (Th17) при аллогенной трансплантации клеток костного мозга у крыс Wistar.	1075
<i>Червякова Я.В., Масленникова А.К.Ю.</i>	
Исследование влияния локализации защитного С-пептида 2P23 на N-конце экзогенного CXCR4 на хемотаксис клеток и защитные свойства пептида	1077
<i>Черемных А.И., Никитин А.А., Ковалева П.А., Львов В.А., Сенатов Ф.С.</i>	
Влияние магнитных наночастиц феррита кобальта на физико-механические свойства, биосовместимость и эффект памяти формы полилактида	1079

<i>Черкашина О.Л., Цитрина А.А., Аболин Д.С., Косых А.В., Воротеляк Е.А., Калабушева Е.П.</i>	
Паттерн пролиферации в регенерирующей коже человека на модели ксенотрансплантации	1081
<i>Чечехина Е.С., Волошин Н.С., Кулебякин К.Ю., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.</i>	
Создание и применение инструмента для прижизненной оценки старения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на основе фазово-контрастных изображений	1083
<i>Чечехина Е.С., Каменков С.С., Кулебякин К.Ю., Антропова Ю.Г., Зиновьева А.А., Бахчинян Е., Ефименко А.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.</i>	
Роль межклеточной сигнализации в нарушении адипогенной дифференцировки МСК при старении	1085
<i>Чибирова Т.Т., Кокаев Р.И., Ислаев А.А., Кокаев Г.С., Скупневский С.В.</i>	
Влияния серотонина адипината на пролиферацию и способность к миграции <i>in vitro</i> мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов кожи и подкожно-жировой клетчатки	1087
<i>Чижикова Г.А., Бильдюг Н.Б.</i>	
Влияние коллагена IV на смену изоформ актина в мезенхимных стволовых клетках человека	1089
<i>Шангина О.Р., Мусина Л.А., Чеканова А.А., Сельский Н.Е.</i>	
Аллотрансплантация соединительнотканых биоматериалов в проекции дентального имплантата	1091
<i>Шарикова Н.А., Вдовиченко А.Ю.</i>	
Электропроводящие высокопористые композиционные материалы для регенеративной медицины	1093
<i>Шариков Р.В., Стрельцов Д.Р., Малахов С.Н., Бакиров А.В., Тенчуринов Т.Х., Богущ В.Г., Чвалун С.Н.</i>	
Исследование физико-механических свойств материалов для регенеративной медицины на основе рекомбинантных спидроинов	1095
<i>Шаяхметов Р.И., Хисматуллина З.Р.</i>	
Связь неоваскуляризации с морфофункциональным состоянием микроокружения мультиформной глиобластомы	1097
<i>Шевелева О.Н., Протасова Е.А., Буторина Н.Н., Медведев С.П., Григорьева Е.В., Лядова И.В.</i>	
Влияние интерферона В на эктодермальную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека	1099
<i>Шеденкова М.О., Салихова Д.И., Некрасова А.А., Бакаева З.В., Гольдштейн Д.В.</i>	
Нейропротективное действие внеклеточных везикул глиальных клеток-предшественников человека, опосредованное активацией PI3K-Akt сигнального пути	1101
<i>Шелег С.А., Куренкова А.Д., Файзуллин А.Л., Ефремов Ю.М., Тимашев П.С.</i>	
Оценка возможности использования рёберного хряща для мозаичной хондропластики коленного сустава у крыс	1104
<i>Шептий В.В., Брускин С.А., Золотаренко А.Д.</i>	
Миниатюрная нуклеаза Un1Cas12f1 — эффективный инструмент для редактирования генома	1106
<i>Шерман Д.К., Богомякова М.Е., Емец Е.В., Богомазова А.Н., Лагарькова М.А.</i>	
Рецептор NKG2D играет ключевую роль в НК-клеточном ответе на фибробластоподобные производные ИПСК	1108
<i>Шитова М.С., Жданов Д.Д., Рябченко А.С., Воротеляк Е.А., Морзун Е.И.</i>	
Культивирование и банкирование клеток линии Трег	1110
<i>Шишамаков М.А., Воловиков Е.А., Богомазова А.Н., Красильникова И.А., Бонарцев А.П., Савостьянов К.В., Бакаева З.В.</i>	
Клеточная модель спинальной мышечной атрофии на основе моторных нейронов, полученных путём нейрональной дифференцировки человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток	1112
<i>Шкап М.О., Докукин Н.В., Самойлова Е.М., Снежкина А.В., Кудряшова О.М., Дорошенко Ю.С., Ковальчук А.М., Баклаушев В.Н.</i>	
Транскриптомное профилирование травмы спинного мозга после интраспинальной трансплантации плацентарных МСК	1115
<i>Шнайдер Т.А., Юнусова А.М., Яковлева С.А., Чвилёва А.С., Белокопытова П.С., Хабарова А.А., Рьжкова А.С., Серов О.Л., Пристяжнюк И.Е., Смирнов А.В.</i>	
Исследование молекулярных и клеточных механизмов нарушений развития головного мозга человека, вызванных мутациями в гене <i>CNTN6</i> , на модели церебральных органоидов	1117
<i>Штам Т.А., Емельянова С.С., Гараева Л.А., Соломина Л.А., Путевич Е.Д., Спицына А.С., Коневега А.Л.</i>	
Растительные экстраклеточные везикулы из сока съедобных растений и микроводорослей для регенерации кожи за счет активации гиалуранансинтаз и эластина	1119
<i>Шульгина А.Е., Сорोगина Д.А., Погосова М.А., Павлова С.В., Дементьева Е.В., Закиян С.М.</i>	
Создание клеточной модели гипертрофической кардиомиопатии на основе кардиомиоцитов, полученных из ИПСК с патогенным вариантом с.966G>A в гене <i>MYBPC3</i>	1121
<i>Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Чепурных Е.Е.</i>	
Применение блокаторов MAP киназ для регулирования роста соединительной ткани при полостных операциях	1123

<i>Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г.</i>	
Активность NADH цитохром b5 редуктазы 3 при регенерации мышечной ткани.....	1125
<i>Шурыгина И.А., Трухан И.С., Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г.</i>	
Новый флуоресцентный сенсор для визуализации лизосом.....	1127
<i>Эйгель Д.М., Исаева Е.В., Кисель А.А., Демяшкин Г.А., Атякшин Д.А., Клабуков И.Д., Барановский Д.С., Шегай П.В., Иванов С.А., Каприн А.Д.</i>	
Лазерная гравировка эластического хряща для тканевой инженерии ушных трансплантатов.....	1129
<i>Юдинцева Н.М., Колесниченко Ю.В., Шатрова А.Н., Аксенов Н.Д., Ярцева Н.М., Шевцов М.А., Федоров В.С., Зиганшин Р.Х., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.</i>	
Поиск перспективных молекул-мишеней для лечения или профилактики патологических рубцов.....	1131
<i>Юрканова М.Д., Кошелева Н.В., Теплова А.А., Тимашев П.С., Власова И.И.</i>	
Продукция H ₂ O ₂ различными фенотипами провоспалительных макрофагов M1 человека: пролонгация окислительного стресса, опосредованного миелопероксидазой нейтрофилов.....	1133
<i>Юркина Е.Г., Ефимов Д.Ю., Примакова Е.А., Назарова Е.А., Сыманович А.А., Романова И.А., Смольникова В.В., Янушевская Е.А., Дедюля Н.И., Кривенко С.И., Щерба А.Е.</i>	
Использование клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из плацентарно-пуповинного комплекса, у пациентов с декомпенсированным циррозом печени.....	1135
<i>Юрова К.А., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Тодосенко Н.М., Мелащенко О.Б., Лигатюк Д.Д., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.</i>	
Кооперация стромальных стволовых и иммунокомпетентных клеток на <i>in vitro</i> модели регенерации костной ткани.....	1137
<i>Юсина П.В., Усакин Л.А., Шинин В.В., Кляйн О.И., Пантелеев А.А.</i>	
Гипоксия-зависимый регуляторный каскад Hif1 в эмбриогенезе кожных покровов лабораторных мышей.....	1140
<i>Яглова Н.В., Обернихин С.С., Яглов В.В., Назимова С.В., Тимохина Е.П., Цомартова Д.А.</i>	
Дисрегуляция морфогенеза как эффективная модель для выявления механизмов самоподдержания клеточных популяций с низким регенераторным потенциалом.....	1142
<i>Якимова А.О., Клабуков И.Д., Барановский Д.С., Евстратова Е.С., Иванов С.А., Шегай П.В., Каприн А.Д.</i>	
Регуляторные ограничения в производстве биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов в России: вызовы и пути решения.....	1144
<i>Якимова А.О., Клабуков И.Д., Барановский Д.С.</i>	
Мобильные производственные модули для изготовления биотехнологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов по индивидуальным назначениям.....	1146
<i>Яковлева А.С., Голубенко М.А., Ещанова Е.Е., Дьякова Н.В., Архипова С.С., Нагиев К.К., Ахмадиева Л.А., Салафутдинов И.И., Мухамедьяров М.А.</i>	
Искусственные генно-инженерные микровезикулы, несущие терапевтические белки, для терапии бокового амиотрофического склероза на модели мышей FUS.....	1148
<i>Яковлева А.С., Лайков А.В., Лопухов Л.В., Голубенко М.А., Маркелова М.И., Мухамедьяров М.А., Салафутдинов И.И.</i>	
Метаболические профили в модели прогрессирующего бокового амиотрофического склероза SOD1-G93A мышей.....	1150
<i>Яковлева С.А., Юнусова А.М., Чвилева А.С., Шнайдер Т.А.</i>	
Изучение роли рецепторов Notch1 и Notch2 в ранних этапах развития головного мозга человека на модели церебральных органоидов.....	1152
<i>Якубец Д.А., Маркина Е.А., Тырина Е.А., Буравкова Л.Б.</i>	
Высокопоточный автоматизированный анализ изображений гетероклеточных микроэксплантов костного мозга мышей с помощью Cellprofiler и Cellpose.....	1154
<i>Япрынцева М.А., Первушин Н.В., Сазонова Е.В., Копеина Г.К., Байрамова Д.О., Животовский Б.Д.</i>	
Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с приобретенной устойчивостью к химиотерапевтическому препарату цисплатину.....	1156

Абакушина Е.В.^{1,2}, Степанова И.А.^{1,2} ✉, Румянцев С.А.¹

Оценка противоопухолевой активности НК-клеток на модели *in vivo*

¹ ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

² ООО «Текон МП», Москва, Россия

✉ irinkastepanova@yandex.ru

Аннотация. Актуальность поиска новых препаратов для борьбы с различными видами рака несомненна. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является иммунотерапия [1]. Активно развиваются методы иммунотерапии на основе НК-клеток на стадиях доклинической и клинической разработки [2].

Ключевые слова: активированные НК-клетки человека; карцинома предстательной железы; противоопухолевая эффективность; иммунодефицитные мыши.

Abakushina E.V.^{1,2}, Stepanova I.A.^{1,2}, Roumiantsev S.A.¹

Evaluation of antitumor activity of NK cells in an *in vivo* model

¹ Medical Endocrinology Research Center, Moscow, Russia

² Tecon MP LLC, Moscow, Russia

Abstract. The relevance of searching for new drugs to combat various types of cancer is undeniable. One of the most promising areas in this area is immunotherapy [1]. There is intensive development of NK cell-based immunotherapy methods at the preclinical and clinical development stages [2].

Keywords: activated human NK cells; prostate carcinoma; antitumor activity; immunodeficient mice.

Известно, что НК-клетки обладают выраженной противоопухолевой цитолитической активностью и используются в доклинических и клинических исследованиях для изучения их терапевтического потенциала [3]. Целью исследования было оценить эффективность иммунотерапии с использованием НК-клеток человека на *in vivo* моделях ксенотрансплантатов карциномы предстательной железы DU 145 на иммунодефицитных мышах SCID. В эксперименте использовали 8 самцов иммунодефицитных мышей с SPF статусом здоровья, в возрасте 8 недель, массой $28,4 \pm 0,9$ г. Для получения гетеротопических ксенографтов клеточную суспензию опухолевых клеток DU 145 вводили мышам подкожно в область правой задней лапы в дозе 107 клеток/животное. Контрольным мышам подкожно вводили NaCl 0,9% в объеме 50 мкл, опытным животным подкожно вводили 50 мкл суспензии НК-клеток в дозе 1–2 млн клеток/животное 6-кратно на 0, 2, 4, 6, 8 и 10 сутки после достижения размера опухоли в 100 мм^3 . Опухолевые узлы измеряли с помощью электронного штангенциркуля и вычисляли объем опухоли (V , мм^3), по формуле:

$$V = (a \times b^2) \cdot 0,52,$$

где a — длина опухоли, b — ширина опухоли. Состояние животных в течение всего эксперимента оценивали по физиологическим показателям (масса тела, температура тела). На протяжении всего эксперимента было отмечено, что масса и температура тела статистически значимо не различались у мышей опытной и контрольной группы. К концу опыта (30-е сутки) установлено, что средний объем опухолевых узлов в опытной группе был на 13,2% меньше, чем у контрольных ($V_{\text{cp}} = 2042,1 \pm 330,7$ и $2311,85 \pm 286,4 \text{ мм}^3$ соответственно), но данные отличия не были статистически значимыми.

Ранее при изучении биораспределения NK-клеток у мышей с ксенографтом опухоли было показано, что после подкожного введения меченых радиофармпрепаратом NK-клеток основная доля введенной радиоактивности оставалась в месте введения, что многократно превышало содержание РФП во внутренних органах за 48 часов наблюдения; при этом специфического накопления радиоактивности в подкожном ксенографте не наблюдалось [4]. Предположительно, в нашем исследовании с данным эффектом может быть связана невысокая противоопухолевая активность NK-клеток при подкожном способе введения. Более перспективными представляются дальнейшие исследования эффектов NK-клеток при использовании других способов введения терапевтической суспензии клеток (внутривенное, внутрибрюшинное и т.д.), а также использование других видов ксенографтов в качестве модели опухоли (ортотопические, метастатические и т.д.).

В результате данного исследования при анализе размера ксенографтов DU-145 наблюдалось замедление их роста после введения NK-клеток. Требуется дополнительные исследования на больших выборках животных для проведения полноценного статистического анализа.

Источник финансирования. Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно-технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15-2022-310.

Список литературы

1. Starska-Kowarska K. The role of different immunocompetent cell populations in the pathogenesis of head and neck cancer — regulatory mechanisms of Pro- and anti-cancer activity and their impact on immunotherapy // *Cancers*. 2023. Vol. 15, N 6. ID 1642. doi: 10.3390/cancers15061642
2. Liu S., Galat V., Galat Y., et al. NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development // *J Hematol Oncol*. 2021. Vol. 14. ID 7. doi: 10.1186/s13045-020-01014-w
3. Абакушина Е.В., Гельм Ю.В., Пасова И.А., Бажин А.В. Иммунотерапевтические подходы к лечению больных колоректальным раком // *Биохимия*. 2019. Т. 84, № 7. С. 923–933. EDN: VHQMSX doi: 10.1134/S0320972519070042
4. Степанова И.А., Михайловский Н.В., Рыбачук В.А., Абакушина Е.В. Биораспределение NK-клеток человека у иммунодефицитных мышей с ксенографтами опухолей с помощью метода ОФЭКТ-КТ // *Биофармацевтический журнал*. 2024. Т. 16, № 2. С. 34–40. EDN: ECQWWJ doi: 10.30906/2073-8099-2024-16-2-34-40

Абдрахманова И.И.^{1,2} ✉, Городилова А.В.¹, Филин И.Ю.¹, Чернов В.М.^{1,2}, Соловьева В.В.¹, Ризванов А.А.¹

Анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток Вартонового студня, экспрессирующих апоптоз-индуцирующий лиганд TRAIL

¹ Казанский федеральный университет, Казань, Россия

² ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

✉ ilma25.94@mail.ru

Аннотация. Иммуноterapia является перспективным подходом для лечения злокачественных новообразований. В данной работе был проведен анализ противоопухолевой активности мезенхимных стволовых клеток Вартонового студня, экспрессирующих апоптоз-индуцирующий лиганд TRAIL, на клетках глиобластомы SNB-19 и U-138 MG.

Ключевые слова: противоопухолевая терапия; глиобластома; апоптоз-индуцирующий лиганд TRAIL.

Abdrakhmanova I.I.^{1,2}, Gorodilova A.V.¹, Filin I.Yu.¹, Chernov V.M.^{1,2}, Solovyeva V.V.¹, Rizvanov A.A.¹

Analysis of antitumor activity of Wharton's jelly mesenchymal stem cells expressing the apoptosis-inducing ligand TRAIL

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Abstract. Immunotherapy is a promising approach for the treatment of malignant neoplasms. In this work, we analyzed the antitumor activity of Wharton's jelly mesenchymal stem cells expressing the apoptosis-inducing ligand TRAIL on SNB-19 and U-138 MG glioblastoma cells.

Keywords: antitumor therapy; glioblastoma; apoptosis-inducing ligand TRAIL.

На сегодняшний день злокачественные новообразования (ЗНО) остаются одной из ведущих причин смертности во всем мире. Злокачественные опухоли головного мозга определяются как одна из самых опасных форм ЗНО из-за сложностей в терапии, которые связаны с анатомией и физиологией мозга в отношении терапевтических стратегий, используемых для лечения ЗНО головного мозга, а также из-за гетерогенности самих опухолей центральной нервной системы. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) из Вартонового студня (ВС-МСК) обладают характеристиками настоящих стволовых клеток. Они демонстрируют высокую пролиферативную активность, оказывают иммуномодулирующее воздействие на лимфоциты и не трансформируются в тератогенные или канцерогенные клетки при трансплантации *in vivo*. МСК обладают выраженным тропизмом к опухолевым нишам. Это уникальное свойство делает МСК идеальным кандидатом для адресной доставки противоопухолевых средств, таких как, например, цитокины — белки, вырабатываемые иммунной системой. Обширные исследования, проведенные на клеточных культурах и модельных животных показали, что цитокины проявляют широкий спектр противоопухолевой активности, тем самым вызывая интерес для исследователей. Известно, что TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд (TRAIL) способствует индукции апоптоза в опухолевых клетках, при этом не повреждая здоровые клетки. Это делает его привлекательным противоопухолевым агентом для целевой терапии ЗНО.

В данной работе из Вартонового студня человека были выделены мезенхимные стволовые клетки (в соответствии с утвержденными этическими стандартами и действующим законодательством, информированное

согласие было получено от каждого донора), которые имели фибробласто-подобную морфологию, синтезировали основные поверхностные маркеры МСК (CD105, CD44, CD29, CD73 и CD90) и обладали способностью к направленной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Для получения рекомбинантных лентивирусов LV-TRAIL и LV-Katushka2S проводили ко-трансфекцию пакующей линии клеток HEK293T (ATCC CRL-3216). Для получения генетически модифицированных BC-МСК, со сверхэкспрессией TRAIL или Katushka2S, клетки инфицировали полученными LV-TRAIL или LV-Katushka2S. Полученную клеточную линию МСК-TRAIL отбирали путем культивирования в среде с бластицидином S (5 мкг/мл) в течение 7 дней, а МСК-Katushka2S по флуоресценции дальне-красного флуоресцентного белка Katushka2S. Экспрессию TRAIL подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и вестерн-блот анализом. Для оценки противоопухолевой активности как нативных, так и генетически модифицированных МСК, 3×10^5 МСК высевали на планшеты и культивировали в течение 72 часов, после чего собирали кондиционированную среду (КС). Далее клетки глиобластомы человека линий SNB-19 (ATCC CRL-2219) и U-138 MG (ATCC HTB-16) выращивали в свежей среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) или в КС от нативных или генетически модифицированных BC-МСК. Пролиферативную активность опухолевых клеток определяли с помощью MTS-теста (Promega, США). Через 48 часов наблюдалось снижение пролиферативной активности опухолевых клеток, которые культивировались в КС от генетически модифицированных BC-МСК с LV-TRAIL, у U-138 MG ($74,38 \pm 8,38\%$) и SNB-19 ($62,96 \pm 2,81\%$) по сравнению с опухолевыми клетками, которые культивировались в КС от нативных BC-МСК (U-138 MG — $85,77 \pm 7,84\%$, S.NB-19 — $89,30 \pm 0,67\%$) и в свежей среде RPMI-1640 (U-138 MG — $100 \pm 1,56\%$, SNB19 — $100 \pm 2,38\%$). Совместное культивирование МСК и опухолевых клеток в течение 48 часов указывало на угнетение пролиферации опухолевых клеток как для клеток SNB-19, так и U-138 MG. Таким образом, установлено, что МСК-LV-TRAIL способны подавлять пролиферацию клеток SNB-19 и U-138 MG, что также подразумевает необходимость проведения дальнейших исследований модифицированных BC-МСК-TAIL *in vivo*. Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Абдулкадиева М.М.^{1,2}✉, Слонова Д.А.¹, Антонова Н.П.¹, Собынин К.А.^{1,3}, Литвиненко В.В.², Паршина О.В.¹, Гусева Т.С.¹, Васина Д.В.¹, Сысолятина Е.В.¹

Разработка мышинной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран для оценки антибактериального и ранозаживляющего эффектов эндолизина LysAm24-SMAP

¹ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² ОИВТ РАН, Москва, Россия

³ РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

✉ maryam094@yandex.ru

Аннотация. Целью данной работы был подбор оптимальных параметров мышинной модели инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* ран с учетом массы мышей, заражающей дозы и техники моделирования и ведения ран, и оценка антибактериального и ранозаживляющего эффектов геля с эндолизином LysAm24-SMAP на данной модели.

Ключевые слова: мышинная модель; *Pseudomonas aeruginosa*; эндолизины; LysAm24-SMAP; ранозаживление.

Abdulkadieva M.M.^{1,2}, Slonova D.A.¹, Antonova N.P.¹, Sobyenin K.A.^{1,3}, Litvinenko V.V.², Parshina O.V.¹, Guseva T.S.¹, Vasina D.V.¹, Sysolyatina E.V.¹

Antibacterial and wound-healing effect of endolysin LysAm24-SMAP *in vivo* in mouse models of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds

¹ Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² JIHT RAS, Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The aim of this work was to select optimal parameters of a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds (weight of mice, the infecting dose and the technique of wound modeling and management) for evaluating the antibacterial and wound-healing effects of the endolysin LysAm24-SMAP gel.

Keywords: mouse model; *Pseudomonas aeruginosa*; endolysins; LysAm24-SMAP; wound healing.

Инфицирование ран приводит к переходу их в хроническое состояние, что ухудшает качество жизни пациентов, увеличивает риск инвалидизации и смертности. Хронические раны являются серьезной проблемой и финансовым бременем для систем здравоохранения во всем мире [1, 2]. Заживление ран — сложный динамический многофазный процесс восстановления поврежденных тканей. Разработка средств для ранозаживления невозможна без адекватных моделей *in vivo*. Перспективным ранозаживляющим веществом является генноинженерный белок эндолизин LysAm24-SMAP, состоящий из лизоцим-подобной N-ацетилмурамидазы, слитой с модифицированным антимикробным пептидом SMAP-29 [3, 4]. Целью данной работы были: 1) подбор оптимальных параметров мышинной модели инфицированных *P. aeruginosa* ран; 2) оценка антибактериального и ранозаживляющего эффектов геля с эндолизином LysAm24-SMAP.

Для достижения первой цели мышам линий BALB/c и C57BL/6, самцам, $m = 18–22$ г ($n = \min 10$ для каждой группы) формировали полнослойные раны ($d = 12$ мм), после чего на поверхность кожи наклеивали предотвращающие контракцию кольца с аналогичным диаметром. *Pseudomonas aeruginosa* (штаммы 2943, 21) в дозах $10^6, 10^7, 10^8, 10^9$ кл/рану вносили в рану в матриксе из 1% метилцеллюлозы, поверхность раны

заклеивали медицинским пластырем. Все манипуляции с животными проводили с использованием изофлюранового наркоза.

Использование кольца предотвращало контракцию раны. Заклеивание раневой поверхности приводило к формированию гнойных масс к 3-му дню эксперимента на обеих линиях мышей в 100% случаев. Оптимальная инфицирующая доза составила 10^8 кл/рана. На мышах линии C57BL/6 выраженность воспалительной реакции и объем гнойных масс были ниже, чем для мышей линии BALB/c. На 2-й день после инфицирования наблюдалось 100-кратное увеличение количества бактерий, и затем каждые 24 ч обсемененность снижалась приблизительно на порядок. Высевы на 7-й день проводить было нецелесообразно в связи с образованием плотного струпа. Развитие воспаления было подтверждено гистологически — на 4-й день в раневом ложе наблюдались обильные гнойно-некротические массы, под ними отложения эозинофильной массы и зачатки грануляционной ткани, инфильтрированной лейкоцитами. Подкожная мышца и фасция также были инфильтрированы лейкоцитами. У некоторых животных с краю раневого дефекта были сформированы «карманы», заполненные гнойным экссудатом. На 7-й день в ране под струпом находились гнойно-некротические массы, но отмечалось активное кровоснабжение грануляционной ткани и инфильтрация ее лейкоцитами, В-клетками и плазмощитами. Раневой дефект заполнялся грануляционной тканью, содержащей фибробласты и фиброциты.

В дальнейших экспериментах по оценке антибактериального и ранозаживляющего эффектов эндолизина использовали следующие параметры мышиной модели: самцы BALB/c, $m = 18–22$ г, инфицирующая доза *Pseudomonas aeruginosa* 21 10^8 кл/рану.

Через 24, 28 и 72 ч после формирования инфицированных ран в них вносили дважды в день по 100 мкл геля на основе водорослевого альгината с концентрацией эндолизина 1 мг/мл или 2 мг/мл. В контрольной группе животные не получали препараты, в группе плацебо вносили только альгинатный гель. Смывы с раневой поверхности с последующими микробиологическими посевами производили на 1, 2, 3, 4 и 7-й дни эксперимента до нанесения препаратов эндолизинов. Материал для гистологического исследования отбирали на 4-й и 7-й дни.

Микробиологическое исследование показало снижение бактериальной обсемененности раневой поверхности при использовании эндолизинов на 4-й и 7-й день эксперимента на 79,6% и 92,2% соответственно ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой и группой плацебо. Достоверных различий между группами, получившими эндолизин в разных концентрациях, не наблюдалось, так же как и различий между контрольной группой и плацебо.

Гистологические различия состояния раневого ложа обозначились к 7-му дню эксперимента. В группах исследуемых препаратов (вне зависимости от дозы эндолизина) наблюдалась деградация гнойно-некротических масс под струпом, закрытие раневого дефекта грануляционной тканью, миграция кератиноцитов с края раны в сторону дефекта и отторжение струпа. В то же самое время, в контрольной группе и в группе плацебо сохранялся значительный объем гнойно-некротической массы под струпом и лейкоцитарная инфильтрация формирующейся грануляционной ткани.

Таким образом, было установлено, что применение эндолизина LysAm24-SMAP приводило к снижению бактериальной обсемененности раневой поверхности к 4-му дню и к более полноценному формированию грануляционной ткани к 7-му дню эксперимента по сравнению с контролем и группой плацебо, ускоряя процесс ранозаживления, что говорит о терапевтическом потенциале этого препарата для лечения инфицированных ран.

Список литературы

1. Sen C.K. Human wound and its burden: Updated 2020 compendium of estimates // *Adv Wound Care*. 2021. Vol. 10, N 5. P. 281–292. doi: 10.1089/wound.2021.0026
2. Раны и раневые процессы. Учебно-методическое пособие для интернов, ординаторов и врачей / под ред. В.В. Кочубей. Краснодар, 2016.
3. Vasina D.V., Antonova N.P., Grigoriev I.V., et al. Discovering the potentials of four phage endolysins to combat gram-negative infections // *Front Microbiol*. 2021. Vol. 12. ID 748718. doi: 10.3389/fmicb.2021.748718
4. Dawson R.M., Liu C.Q. Analogues of peptide SMAP-29 with comparable antimicrobial potency and reduced cytotoxicity // *Int J Antimicrob Agents*. 2011. Vol. 37, N 5. P. 432–437. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.007

Агарёва М.Ю.^{1,2} ✉, Стафеев Ю.С.¹, Мичурина С.С.¹, Шестакова Е.А.³, Томилова А.О.³, Синеокая М.С.³,
Меньшиков М.Ю.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}, Шестакова М.В.³

Бариатрическая операция способствует усилению термогенной активности белых и бежевых адипоцитов

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

✉ amarrgo1999@gmail.com

Аннотация. Данная работа посвящена изучению термогенных свойств мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани пациентов с сахарным диабетом 2-го типа через шесть месяцев после бариатрической операции

Ключевые слова: бариатрическая операция; мезенхимальные стволовые клетки; сахарный диабет 2-го типа.

Agareva M.^{1,2}, Stafeev I.¹, Michurina S.¹, Shestakova E.³, Tomilova A.³, Sineokaya M.³, Menshikov M.¹,
Parfyonova Ye.^{1,2}, Shestakova M.³

Bariatric surgery promotes increased thermogenic activity of white and beige adipocytes

¹ National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Endocrinology Research Centre, Moscow, Russia

Abstract. This work is devoted to the study of the thermogenic properties of mesenchymal stem cells of subcutaneous adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus six months after bariatric surgery

Keywords: bariatric surgery; mesenchymal stem cells; type 2 diabetes mellitus.

Мезенхимальные стволовые клетки подкожной жировой ткани (МСК пЖТ) могут дифференцироваться в белом и бежевом адипогенных направлениях. Функция белых адипоцитов заключается в хранении избытка питательных веществ в виде триглицеридов, в то время как бежевые адипоциты сжигают запасенные триглицериды в процессе термогенеза. Термогенез обеспечивает регуляцию энергетического баланса, углеводного и жирового обмена, однако активация данного процесса значительно нарушается при сахарном диабете 2-го типа (СД2Т). Бариатрическая хирургия является одним из методов терапии СД2Т, она способствует снижению веса, изменению морфологии жировой ткани и в большинстве случаев приводит к ремиссии СД2Т. Однако в настоящее время нет работ, изучающих изменение свойств МСК ЖТ после бариатрической операции (БО). Поэтому целью нашей работы было исследование влияния бариатрической операции на термогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани пациентов с сахарным диабетом 2-го типа.

В экспериментах использовали МСК, полученные из подкожной ЖТ пациентов с СД2Т до бариатрической операции и спустя полгода после бариатрической операции (пациенты с ИМТ > 35 кг/м², длительность ожирения более 10 лет). Дифференцировку адипоцитов в белом и бежевом направлениях осуществляли в течение 21 дня по стандартному протоколу. Размер липидных капель оценивали с помощью красителя BODIPY493/503. Содержание основного маркера адипогенеза FABP4, а также маркера бежевой

дифференцировки UCP-1 оценивали методом иммуноблоттинга. Термогенную активность детектировали с помощью термочувствительного флуоресцентного красителя ERThermAC.

В результате белого и бежевого адипогенеза было обнаружено увеличение количества мелких капель в адипоцитах, полученных из МСК пЖТ после бариатрической операции. Интенсивность флуоресценции ERThermAC снижалась в клетках после БО, что свидетельствует об увеличении термогенной активности белых и бежевых адипоцитов после БО. При этом экспрессия UCP1 в бежевых адипоцитах после БО также возрастала.

Белые и бежевые адипоциты, полученные из мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани пациентов спустя 6 месяцев после бариатрической операции, обладают увеличенным термогенным потенциалом по сравнению с белыми и бежевыми адипоцитами, полученными из мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани пациентов до бариатрической операции. Усиление термогенной активности данных клеток после БО может приводить к восстановлению энергетического баланса, углеводного и жирового обмена в пЖТ пациентов, что способствует ремиссии СД2Т. Таким образом, полученные результаты вносят значительный вклад в понимание роли МСК пЖТ в ремиссии СД2Т, а также могут способствовать установлению механизмов, реализующих данный процесс.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 22-15-00365.

Агеева Т.В., Плотникова Е.А., Давлетшин Э.Ф., Шигапова Р.Р., Мухамедшина Я.О.✉

Разработка подхода биолуминесцентной оптогенетической стимуляции спинальных мотонейронов поясничного отдела травмированного спинного мозга

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ yana.k-z-n@mail.ru

Аннотация. Таргетированный подход в биолуминесцентной оптогенетической стимуляции спинальных нейронов может стать перспективной терапией неврологических заболеваний благодаря поддержанию и укреплению существующих или формированию новых нейронных связей.

Ключевые слова: оптогенетика; люминопсин; аденоассоциированный вирус; нейрон; гомеобокс 9; целентеразин-зависимая люцифераза.

Ageeva T.V., Plotnikova E.A., Davletshin E.F., Shigapova R.R., Mukhamedshina Y.O.

Development of an approach of bioluminescent optogenetic stimulation of spinal motoneurons of the lumbar injured spinal cord

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Targeted approach in bioluminescent optogenetic stimulation of spinal neurons may be a promising therapy for neurological diseases due to maintenance and strengthening of existing or formation of new neuronal connections.

Keywords: optogenetics; luminopsin; adenoassociated virus; neuron; homeobox 9; celenterazine-dependent luciferases.

Биолуминесцентная оптогенетика (BL-OG) в современной концепции нейробиологии считается новым и перспективным методом нейронной стимуляции. Как наиболее неинвазивный и высокоспецифичный метод модуляции, BL-OG может применяться в терапии широкого ряда неврологических заболеваний. В рамках данного исследования были разработаны и апробированы генетические конструкции AAV-Hb9-LM03-EYFP, AAV-hSyn-mCherry и AAV-CMV-GFP, которые потенциально могут использоваться в качестве инструментов BL-OG для таргетированной модификации клеток. Разработанные плазмидные генетические конструкции, далее использованные для сборки рекомбинантных вирусов, были проверены *in vitro* с помощью рестрикционного анализа и иммуноцитохимического (ИЦХ) анализа. Рестрикционный анализ позволил подтвердить правильность структуры плазмид, ИЦХ анализ показал корректность функционирования генетических конструкций, обеспечивающих необходимую экспрессию целевых белков в клетках, что определяло техническую надежность и биологическую активность разработанных векторов. Для высокого уровня трансдукции клеток в *in vivo* применении из вышеописанных конструкций были собраны аденоассоциированные вирусы 9 серотипа, обладающие специфичностью к клеткам ЦНС. Далее крысам были интратекально инъецированы собранные аденоассоциированные вирусы AAV9-CMV-GFP (контроль, $n = 3$), AAV9-hSyn-mCherry (контроль 2, $n = 3$) и/или AAV9-Hb9-LM03-EYFP (BL-OG, $n = 3$) в области L6-S1 позвонков. На 7-е сутки после *in vivo* введения вирусов гистологические срезы спинного мозга (сегменты C3-4, Th7-8, L1-2, S1) и мозжечка исследуемых групп были проанализированы методом конфокальной микроскопии для оценки количества нейронов, экспрессирующих репортерные белки разработанных генетических конструкций. Было показано, что экспрессия mCherry находилась под контролем паннейронального человеческого синапсина-промотора

(hSyn) и была равномерно сконцентрирована на нейронах, расположенных в пластинках IV-VIII и X, с незначительной экспрессией в пластинке IX. Кроме того, промотор Hb9 успешно ограничил экспрессию EYFP почти исключительно мотонейронами в пластинке IX. Экспрессия GFP под контролем CMV значительно ниже в исследуемых сегментах на 48% и 36% по сравнению с группами, трансдуцированные конструкциями AAV9-hSyn-mCherry и AAV9-Hb9-LM03-EYFP в области IX пластинки соответственно. Однако экспрессия GFP была обнаружена не только в нейронах, но также в клетках глии, особенно в сегментах приближенных к точке интратекальной инъекции. Количество нейронов, экспрессирующих EYFP и mCherry, в области IX пластинки неравномерно распределено по сегментам, с наибольшей экспрессией в поясничном отделе. Для конструкций AAV9-Hb9-LM03-EYFP число трансдуцированных нейронов составило $5,82 \pm 3,06$, а для AAV9-hSyn-mCherry — $7,67 \pm 1,97$ в сегменте L1-2. Примечательно, что в сегменте Th7-8 количество трансдуцированных нейронов в каждой группе было крайне низким, встречались лишь единичные мотонейроны с экспрессией репортерных генов. Функциональность люминопина LM03 у группы крыс с инъекцией AAV9-Hb9-LM03-EYFP оценивалась на 7-е сутки после интратекального введения целентеразина (CTZ) при визуализации IVIS Spectrum. Биолюминесценция в спинном мозге после введения CTZ достигала пика между 10 и 30 минутами и снижалась в течение следующего часа. Таким образом, результаты исследования подтверждают эффективность генетической конструкции AAV9-Hb9-LM03-EYFP для неинвазивной биолюминесцентной оптогенетической стимуляции и рекрутирования мотонейронов, указывая на высокую тропность вирусного вектора к нейронам ЦНС за счет промотора, обеспечивающего таргетированное воздействие на нейроны IX пластинки.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-75-10041 (<https://rscf.ru/project/23-75-10041/>).

Адешелидзе С.Р.✉, Гетманова Т.Е., Диденко Н.Н., Гатило Ю.Ю.

Новые подходы к улучшению регенерации нервной ткани: применение секретома NCSCs

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

✉ s.r.adeshelidze@mail.ru

Аннотация. Экспериментально доказано — секретом NCSCs стимулирует жизнеспособность, пролиферативную и миграционную активность нейрональных клеток, что позволяет использовать данный бесклеточный продукт в разработке экспериментальной терапии дефектов нервной ткани.

Ключевые слова: стволовая клетка; клетки производные нервного гребня; секретом; глутамат; бесклеточные продукты для регенеративной медицины.

Adeshelidze S.R., Getmanova T.E., Didenko N.N., Gatilo Yu.Yu.

New approaches to improving nerve tissue regeneration: use of NCSCs secretome

FSBEO HE Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. It has been experimentally proven that the NCSCs secretome stimulates the viability, proliferative and migratory activity of neuronal cells, which allows this cell-free product to be used in the development of experimental therapy for defects in nerve tissue.

Keywords: stem cell; neural crest-derived cells; secretome; glutamate; cell-free products for regenerative medicine.

Для разработки методов регенерации нервной ткани особого внимания заслуживает субпопуляция резидентных стволовых клеток производных нервного гребня (Neural crest-derived stem cells, NCSCs) взрослого организма [1, 2].

По крайней мере ограниченное количество NCSCs существует в организме даже взрослого человека. Их можно обнаружить в различных тканях и органах, особенно в челюстно-лицевой области.

Благодаря своей легкодоступности и высокой пластичности, аутологичные NCSCs взрослого организма представляют собой идеальный вид стволовых клеток для использования в регенеративной медицине для стимулирования регенерации нервной ткани.

Первичные культуры стволовых клеток производных нервного гребня (NCSCs) мышей получали ферментативной диссоциацией мягких тканей твердого неба с использованием диспазы (4 мг/мл, 4°C, 8 ч), а затем коллагеназы (0,3 ЕД/мл, 37°C, 90 мин) и культивировали в виде суспензионной культуры в среде DMEM без сыворотки с добавлением B-27 Plus Supplement при 37°C и 10% CO₂. По достижении субконфлюентности на 10-й день первичные нейросферы диссоциировали трипсином, дальнейшее культивирование продолжалось в виде адгезивной культуры в среде DMEM без сыворотки с добавлением B-27 Plus Supplement при 37 °C и 10% CO₂. Смену среды осуществляли каждые 2–3 дня, клетки пассировали по достижении 80–90% конфлюентности монослоя. Для получения секретома на 3-м пассаже некоммутированные NCSCs помещали в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч, после чего супернатант отбирали для дальнейшей его фильтрации и центрифугирования.

Для проведения исследования цитопротективного эффекта секретома клетки нейробластомы мыши линии Neuro-2a высаживали по 5×10⁴ живых клеток в лунки 24-луночных планшетов в следующих условиях:

1-я группа — в 500 мкл среды DMEM (БиолоТ) с добавлением 10% FBS (положительный контроль);
2-я группа — в 500 мкл соответствующей среды с добавлением 10 ммоль/л глутамата (отрицательный контроль);

3-я группа — в 500 мкл соответствующей среды с добавлением 10 ммоль/л глутамата и 10 мг/мл секрета МСК (опыт).

Планшет с пробами помещали в инкубатор при 37°C и 5% CO₂.

Подсчет клеток и уровня их жизнеспособности проводился при помощи автоматического счетчика LoupaFL (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 проведения влияния секрета на миграционную активность использовали scratch test (анализ на «заращение раны») в двух группах:

1-я группа — в 500 мкл среды DMEM (БиолоТ) с добавлением 10% FBS (контроль);

2-я группа — в 500 мкл соответствующей среды с добавлением 10 мг/мл секрета МСК (опыт).

На дне лунки, в культуре, стерильным пластиковым наконечником наносили «царапины», механически снимая клетки с подложки, после чего дважды промывали фосфатно-солевым раствором, оставляя царапину на дне лунки, свободной от клеток. Визуализацию и фотофиксацию царапин осуществляли в течение 48 часов при помощи многофункционального фотометра-имиджера Cytation 1 (BioTek, США). Миграционную активность оценивали морфометрически, подсчитывая площадь «раны», занятую клетками, при помощи программного обеспечения ImageJ.

После действия глутамата жизнеспособность и пролиферативная активность клеток достоверно снижалась из-за индукции апоптоза и составляла 89,71% и 55,29% относительно положительного контроля соответственно. При одновременном введении в среду глутамата и секрета NCSCs жизнеспособность значительно возрастала и составляла соответственно 118,81% и 148,98% относительно клеток, на которые воздействовали только введением глутамата. Миграционная активность клеток опытной группы превышала на 34,42% значения в контроле.

Таким образом, введение секрета аллогенных NCSCs в среду для культивирования нейрональных клеток оказывает стимулирующее влияние на их жизнеспособность, пролиферативную и миграционную активность.

Полученные данные являются основой для дальнейших исследований возможности применения полученного бесклеточного продукта в разработке новых экспериментальных методов улучшения регенерации нервной ткани.

Список литературы

1. Zeuner M.T., Didenko N.N., Humphries D., et al. Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from adult ovine palatal tissue // *Front Cell Dev Biol.* 2018. Vol. 6. ID. 39. doi: 10.3389/fcell.2018.00039
2. Диденко Н.Н., Серенко Т.В., Диденко М.О. Возможность применения секрета стволовых клеток производных нервного гребня в экспериментальной терапии болезни Альцгеймера. В кн.: Материалы международного молодежного форума: «Неделя науки — 2021». Ставрополь, 22–26 ноября 2021 г. Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2021. С. 356–358. EDN: LEJNQO

Азаркина К.Е. ✉, Божокин М.С., Переpletчикова Д.А., Малашичева А.Б.

Влияние сигнального пути Notch на хондрогенную дифференцировку человеческих остеобластов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ kseniya.azarkina@mail.ru

Аннотация. Исследование изучает роль сигнального пути Notch в процессах хондрогенной дифференцировки человеческих остеобластов. Результаты демонстрируют, что индуцирование сигнального пути Notch приводит к снижению экспрессии хондрогенного маркера SOX9, а добавление TGF-beta-3 путём лентивирусной трансдукции подавляет сигнальный путь Notch.

Ключевые слова: хондрогенная дифференцировка; остеобласты; Notch.

Azarkina K.E., Bozhokin M.S., Perepletchikova D.A., Malashicheva A.B.

The effect of the Notch signaling pathway on the chondrogenic differentiation of human osteoblasts

Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study examines the role of the Notch signaling pathway in the processes of chondrogenic differentiation of human osteoblasts. The results demonstrate that the induction of the Notch leads to a decrease in the expression of the chondrogenic marker SOX9, and the addition of TGF-beta-3 by lentiviral transduction suppresses the Notch signaling pathway.

Keywords: chondrogenic differentiation; osteoblasts; Notch.

Остеобласты происходят из мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга и сохраняют некоторые поверхностные маркеры МСК [1], а также способны дифференцироваться в остеогенном и хондрогенном направлениях [2]. МСК широко используются в инженерии хрящевой ткани. Сигнальный путь Notch играет одну из ключевых ролей в остеогенезе, и выяснение роли сигнального пути Notch в процессах хондрогенной дифференцировки может иметь важное значение для терапии поврежденного хряща.

В данном исследовании использовали первичные остеобласты человека, выделенные из губчатой части бедренной кости. Клетки культивировали в стандартных условиях с использованием среды для остеобластов, затем рассаживали в 96-луночный планшет с круглым дном в концентрации 100 тыс. клеток в лунку для дальнейшего формирования клеточных сфероидов. На следующий день проводили лентивирусную трансдукцию клеток. Для активации сигнального пути Notch использовалась лентивирусная конструкция, несущая ген внутриклеточного домена Notch (NICD), для ингибирования пути — шпилечная РНК к гену MAML1 (shMAML1), также использовались конструкции, несущие ген TGF-beta-3, который используется для индукции и усиления хондрогенной дифференцировки, и мастер-ген хондрогенной дифференцировки SOX9. Для контроля вирусной нагрузки использовали шпилечную РНК к гену GFP. На третий день добавляли среду для хондрогенной дифференцировки (Sartorius, Germany) или среду для культивирования остеобластов в случае контрольных проб. Хондрогенную дифференцировку проводили в течение 21 дня. Оценку дифференцировки проводили с помощью окрашивания альциановым синим, который специфически окрашивает хрящевые протеогликаны. Оценку уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени.

Сфероиды или сфероидоподобные образования сформировались во всех лунках, куда добавляли дифференцировочную среду, в контрольных пробах клетки образовали монослой. По данным ПЦР трансдукция клеток NICD вызывала сильное снижение транскриптов гена SOX9, а shMAML1 вызывала повышение экспрессии SOX9 по сравнению с дифференцированным контролем. Кроме того, уровень экспрессии HEY1, мишени Notch, снижался при трансдукции TGF-beta-3, а двойная трансдукция TGF-beta-3 и SOX9 приводила к отсутствию или крайне низкому уровню транскриптов HEY1.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что активация Notch сигнального пути негативно влияет на процессы хондрогенной дифференцировки, а ингибирование приводит к обратному эффекту. Также TGF-beta-3, по-видимому, способствует подавлению Notch сигнального пути в условиях хондрогенной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ проекта 23-15-00320).

Список литературы

1. Krasnova O., Neganova I. Assembling the puzzle pieces. Insights for in vitro bone remodeling // *Stem Cell Rev Rep.* 2023. Vol. 19, N 6. P. 1635–1658. doi: 10.1007/s12015-023-10558-6
2. Manduca P., Descalzi Cancedda F., Cancedda R. Chondrogenic differentiation in chick embryo osteoblast cultures // *Eur J Cell Biol.* 1992. Vol. 57, N 2. P. 193–201. PMID: 1511696

Александр-Синклер Э.И. ✉, Журенков К.Э., Блинова М.И.

Клеточные технологии в регенеративных стратегиях реэпителизации роговицы

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ elga.aleks@gmail.com

Аннотация. Нарушение целостности эпителия роговицы — основа для развития осложнений, приводящих к слепоте. Исследование посвящено поиску клеточных культур и материалов для создания эквивалентов роговицы, способных стать эффективным инструментом в регенеративных стратегиях реэпителизации роговицы.

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

Alexander-Sinclair E.I., Zhurenkov K.E., Blinova M.I.

Cellular technologies in regenerative strategies of corneal reepithelisation

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Violation of the integrity of the corneal epithelium is the basis for the development of complications leading to blindness. The research is devoted to the search for cell cultures and materials that can be used to create a corneal substitute, which could be an effective tool for regenerative strategies in corneal re-epithelialisation.

Keywords: cellular technologies; re-epithelialization; cornea; stem cells; transplantation; pharmacotherapy; corneal substitutes.

Роговица — высокоорганизованная тканевая структура, состоящая из эпителия, стромы и эндотелия, разделённых бесклеточными коллагеновыми слоями. Являясь передней частью наружной оболочки глаза, она подвержена воздействию внешних повреждающих факторов. Восстановление роговицы при повреждении во многом связано с регенераторным потенциалом ее эпителия и зависит от целостности ниши лимбальных стволовых клеток. Для остальных ее структур характерна заместительная регенерация, при которой полного морфофункционального восстановления ткани не происходит. Нарушение процесса регенерации эпителия роговицы может привести к образованию бельма и, как следствие, к слепоте. Роговичная слепота — одна из причин обратимой слепоты, которой можно управлять, используя различные стратегии лечения [1]. Консервативное лечение патологий роговицы не всегда гарантирует восстановление её свойств и функций, а длительное применение местных препаратов может вызывать нежелательные изменения в структуре глазной поверхности, вследствие чего возникает необходимость в хирургических методах лечения, основным из которых является кератопластика [2]. Однако, несмотря на значительные успехи в хирургии роговицы, достигнутые за последние десятилетия, существуют проблемы, ограничивающие эту стратегию. В связи с постоянным увеличением количества пациентов с роговичной слепотой, нуждающихся в хирургическом вмешательстве, остро стоит вопрос о разработке альтернативных методов. Целый ряд возможностей связан с клеточными технологиями. Стратегию на основе культивируемых клеток активно применяют для создания эквивалентов роговицы разных уровней сложности, которые могут быть использованы как для замены ткани роговицы при трансплантации, так и в качестве ее потенциальных моделей *in vitro* для исследования механизмов реэпителизации и скрининга фармакологических и токсикологических свойств лекарственных

препаратов. В стремлении удовлетворить потребность в таких эквивалентах в последние годы в мире достигнуты значительные успехи с использованием природных и синтетических материалов в сочетании с различными клетками [3].

Цель нашего исследования состояла в поиске клеточных культур и материалов, подходящих для создания эффективных эквивалентов роговицы, которые могут стать инструментом для формирования новых подходов для терапии. Нами были разработаны методики выделения стволовых клеток роговичного лимба (CLSC) и слизистой губы (LMSC) из эпителиально-стромальных биоптатов роговичного лимба и слизистой губы кролика и человека. Выявлено, что введенные в культуру клетки имеют нормальный стабильный кариотип, характеризуются высоким пролиферативным потенциалом, экспрессируют основные стволовые и эпителиальные маркеры (ABCB5, ABCG2, ALDH3A1, CK15, CK14, CK3/12, CK5) и обладают высоким дифференцировочным потенциалом, что подтверждает их статус мультипотентных стволовых клеток [4]. Тест-системы на основе CLSC и LMSC, иммортализованных эпителиальных клеток роговицы и конъюнктивы человека были успешно использованы для скрининга фармакологических и токсикологических свойств глазных капель различных фармакологических групп, а также для оценки биосовместимости со скаффолдами на основе синтетических полиэфиров, амниона (AM) и коллагенового геля (CG) [5]. По результатам исследований было разработано несколько оптимальных вариантов эквивалентов эпителия роговицы (CLSC-CG, CLSC-AM, LMSC-AM) и подобраны схемы для рациональной фармакотерапии при их трансплантации. Эксперименты *in vivo* на кроликах продемонстрировали высокий потенциал использования разработанных конструкций и технологий для восстановления эпителия роговицы при лимбальной недостаточности.

Список литературы

1. Singh R., Gupta N., Vanathi M., Tandon R. Corneal transplantation in the modern era // *Indian J Med Res.* 2019. Vol. 150, N 1. P. 7–22. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_141_19
2. Pellegrini G., Rama P., Rocco A., et al. Concise review: hurdles in a successful example of limbal stem cell-based regenerative medicine // *Stem Cells.* 2014. Vol. 32, N 1. P. 26–34. doi: 10.1002/stem.1517
3. Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., и др. Современные подходы к проблеме выбора носителя для культивирования стволовых клеток роговицы в лечении лимбальной недостаточности // *Офтальмологические ведомости.* 2018. Т. 11, № 2. С. 48–56. EDN: URIPEP doi: 10.17816/OV11248-56
4. Zhurenkov K.E., Alexander-Sinkler E.I., Gavriyik I.O., et al. Labial mucosa stem cells: isolation, characterization, and their potential for corneal epithelial reconstruction // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2022. Vol. 63, N 8. P. 16–16. doi: 10.1167/iops.63.8.16
5. Zhurenkov K.E., Lobov A.A., Bilyug N.B., et al. Focal adhesion maturation responsible for behavioral changes in human corneal stromal fibroblasts on Fibrillar substrates // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, N 16. ID 8601. doi: 10.3390/ijms25168601

Александрова А.Д.✉, Гайдамака А.О., Воротеляк Е.А.

Роль сигнального пути Notch в функциональной активности CD90⁺ прогениторной клеточной популяции стромы эндометрия матки мыши

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

✉ alena.alek.00@mail.ru

Аннотация. Сигнальный путь Notch участвует в последовательной смене фаз пролиферации, дифференцировки и гибели клеток эндометрия. Предполагается способность сигнального пути Notch определять функциональное состояние эндометрия посредством влияния на прогениторные клетки в его составе.

Ключевые слова: строма эндометрия; прогениторные клетки; сигнальный путь Notch; имплантация.

Alexandrova A.D., Gaidamaka A.O., Vorotelyak E.A.

The role of Notch signaling in the functional activity of the CD90⁺ progenitor cell population of mouse endometrial stromal cells

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The Notch signaling pathway is involved in the replacement phases of cell proliferation, differentiation and death in the endometrium. The functional state of the endometrium is thought to be regulated by Notch-signaling by affecting progenitor cells.

Keywords: endometrial stroma; progenitor cells; Notch signaling pathway; implantation.

Эндометрий является внутренним слоем матки, который претерпевает значительные функциональные и морфологические изменения на каждом этапе репродуктивного цикла. В ходе менструального цикла эндометрий человека последовательно проходит фазы пролиферации, клеточной дифференцировки и гибели. Для мыши характерен эстральный (вагинальный) цикл, также включающий последовательные стадии пролиферации и дегенерации клеток. В период подготовки к имплантации строма эндометрия подвергается децидуальной дифференцировке — процессу, который обеспечивает формирование крупных секреторных клеток эпителиоподобной морфологии. Такое динамичное ремоделирование эндометрия свидетельствует о наличии сложных перекрестных взаимодействий, обеспечивающих поддержание всех вышеперечисленных процессов.

Известно, что сигнальный путь Notch регулирует определение судьбы клеток. Его участие в процессах клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза предполагает наличие схожих регуляторных процессов в циклических изменениях эндометрия [2]. Было определено, что компоненты сигнального пути Notch NOTCH4 и NOTCH3 контролируют пролиферативную фазу, а NOTCH1 — фазу децидуальной дифференцировки стромы эндометрия. Подавление *Notch1* снижает экспрессию основных генов-маркеров децидуализации и препятствует успешной имплантации [1]. Эти данные подтверждают участие сигнального пути Notch в регуляции функционального состояния эндометрия.

В стромальном компартменте обнаружены эндометриальные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (ЭМСК), которые участвуют в процессах ремоделирования эндометрия, в том числе и децидуализации. Оказалось, что активный сигнальный путь Notch поддерживает ЭМСК в состоянии пролиферативного покоя *in vitro* [3]. Эти данные предполагают способность компонентов сигнального пути Notch влиять на смену функционального состояния эндометрия в том числе посредством регуляции активности ЭМСК.

Наша работа посвящена изучению влияния сигнального пути Notch на свойства клеток, положительных по маркеру CD90. Ранее мы обнаружили обширное скопление CD90⁺ клеток под люминальным эпителием матки мыши. Мы выявили наличие прогениторных свойств у клеток этой популяции и зафиксировали их участие в процессе имплантации. Для изучения вклада пути Notch в децидуальную дифференцировку CD90⁺ и CD90⁻ клеток мы провели анализ экспрессии генов компонентов сигнального пути Notch. Он показал увеличение уровня экспрессии гена рецептора NOTCH1 в CD90⁺ клетках относительно CD90⁻ клеток при культивировании в присутствии половых стероидных гормонов. При этом уровни экспрессии генов-мишеней *Hes1* и *Hey1* в целом не различались между двумя группами клеток.

Для определения роли сигнального пути Notch в регуляции децидуализации CD90⁺ клеток, культуры подвергались обработке ингибитором γ -секретазы (DAPT). Мы обнаружили снижение экспрессии генов децидуализации как в CD90⁺, так и в CD90⁻ клетках, однако у CD90⁺ клеток данный эффект был более выражен. Чтобы оценить влияние сигнального пути Notch на функционал CD90⁺ клеток в эндометрии во время имплантации, мы вводили DAPT в полость матки мыши до периода имплантации эмбриона. Иммуногистохимическое окрашивание срезов беременной мыши выявило дефекты внедрения эмбриона в строму эндометрия. При этом представленность белка CD90 в такой матке была меньше относительно контрольной матки.

Таким образом, действие сигнального пути Notch более выражено в CD90⁺ клетках относительно CD90⁻ клеток. При этом мы предполагаем, что подавление сигнального пути Notch в большей степени влияет на функциональную дифференцировку CD90⁺ клеток, что может быть причиной нарушения имплантации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-30015) <https://www.rscf.ru/project/21-74-30015/>.

Список литературы

1. Afshar Y., Jeong J.W., Roqueiro D., et al. Notch1 mediates uterine stromal differentiation and is critical for complete decidualization in the mouse // *FASEB J.* 2012. Vol. 26, N 1. P. 282–294. doi: 10.1096/fj.11-184663
2. Cobellis L., Caprio F., Trabucco E., et al. The pattern of expression of Notch protein members in normal and pathological endometrium // *J Anat.* 2008. Vol. 213, N 4. P. 464–472. doi: 10.1111/j.1469-7580.2008.00963.x
3. Zhang S., Chan R.W.S., Ng E.H.Y., Yeung W.S.B. The role of Notch signaling in endometrial mesenchymal stromal/stem-like cells maintenance // *Commun Biol.* 2022. Vol. 5, N 1. ID 1064. doi: 10.1038/s42003-022-04044-x

Александрова Е.В.✉, Ермакова В.В., Кузьмин А.А., Томилин А.Н.

Создание модели изучения цис-регуляторной активности промотора *Pou5f1* в дифференцированных клетках мыши

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ aleksandrova.biotech@gmail.com

Аннотация. Были опробированы и оптимизированы подходы по направленной дифференцировке мышечных ЭСК с нарушенной регуляцией *Pou5f1* с целью оценки цис-регуляторных функций его промотора.

Ключевые слова: стволовые клетки; *Pou5f1*; регуляторные элементы; e-промотор; дифференцировка; клетки трофобластодермы; эндотелиальные клетки; *Cdx2*.

Aleksandrova E.V., Ermakova V.V., Kuzmin A.A., Tomilin A.N.

Establishing a model for studying cis-regulatory activity of the *Pou5f1* promoter in differentiated mouse cells

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. To access cis-regulatory functions of the *Pou5f1* promoter, directed cell differentiation approaches of ESCs with impaired *Pou5f1* activity were tested and optimized.

Keywords: stem cells; *Pou5f1*; regulatory elements; ePromoter; differentiation; trophoblast cells; endothelial cells; *Cdx2*.

Одним из ключевых транскрипционных факторов, ответственных за поддержание плюрипотентного состояния стволовых клеток, является белок Oct4. Данный белок кодируется геном *Pou5f1*, активно экспрессирующимся на ранних стадиях эмбриогенеза. Однако функциональная роль *Pou5f1* в соматических клетках является предметом споров. В пользу наличия такой роли выступают работы, где показана атеропротекторная функция *Pou5f1* в гладкомышечных клетках [1] и эндотелиальных клетках [2] мыши. Одно из возможных объяснений данного явления — цис-регуляторная активность промотора *Pou5f1*.

Для изучения функций промотора *Pou5f1* была использована клеточная линия эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) со следующими модификациями: последовательность гена *Pou5f1* вместе с промотором и другими необходимыми регуляторными элементами была внедрена в эктопическое положение, а эндогенный *Pou5f1* был нокаутирован посредством делеции промотора и первого экзона. В свою очередь в качестве контрольной линии мы получили ЭСК с аналогичной регуляцией экзогена *Pou5f1*, в которых экспрессия эндогенного Oct4 была устранена за счёт CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута, а промотор был структурно сохранён.

Для изучения вклада промоторной последовательности *Pou5f1* в функционирование дифференцированных клеток мы решили отойти от концепции участия гена *Pou5f1* в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний, чтобы проверить универсальность существования активности *Pou5f1* на уровне его последовательности. Для этой цели мы выбрали трофобластные клетки, так как переход тотипотентных клеток эмбриона в трофобластное состояние является первым событием дифференцировки, отделяющим плюрипотентную массу от остальной части клеток. При помощи индуцируемой форсируемой экспрессии мастера-регулятора трофобластных клеток *Cdx2*, помещаемого в высокоактивный локус *Rosa26*, нам удалось отработать эффективный протокол дифференцировки полученных ранее линий ЭСК в трофобластные стволовые клетки. Это доказало, что, несмотря на нарушенную регуляцию *Pou5f1*, форсированная экспрессия соответствующих транскрипционных факторов способна обеспечить переход наших линий в целевое дифференцированное состояние.

К настоящему моменту нами ведётся аналогичная работа, но уже в направлении эндотелиальных клеток. В результате, полученные линии позволят ответить на три вопроса — зависит ли функционирование дифференцированных клеток от активности гена *Pou5f1*, какой характер имеет такая активность и насколько она универсальна.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и гранта РФФИ 24-75-10131.

Список литературы

1. Cherepanova O.A., Gomez D., Shankman L.S., et al. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective // *Nat Med.* 2016. Vol. 22, N 6. P. 657–665. doi: 10.1038/nm.4109
2. Shin J., Tkachenko S., Chaklader M., et al. Endothelial OCT4 is atheroprotective by preventing metabolic and phenotypic dysfunction // *Cardiovasc Res.* 2022. Vol. 118, N 11. P. 2458–2477. doi: 10.1093/cvr/cvac036

Александрова С.А.¹, Давыденко Б.Н.²✉, Дарвиш Д.М.¹, Титова А.Р.²

Математическое моделирование и визуализация при исследовании биоматериалов

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ davydenkworkpost@gmail.com

Аннотация. На примере эксперимента по изучению остеоиндуктивных свойств фиброина шёлка рассматриваются методы математического моделирования и визуализации. Тепловые карты позволили найти дефект автоматического распознавания клеток. Математическая модель дополнила статистический анализ, повысив его точность.

Ключевые слова: биоматериалы; математическое моделирование; тепловые карты; статистика.

Aleksandrova S.A.¹, Davydenko B.N.², Darvish D.M.¹, Titova A.R.²

Mathematical modeling and visualization in biomaterials research

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. This work broadens mathematical modeling and visualisation methods using the experiment on the osteoinductive properties of silk fibroin. Heatmaps helped to identify fallibility in automatic cell detection. Mathematical model complemented the statistical analysis and increased its accuracy.

Keywords: biomaterials; mathematical modeling; heatmaps; statistics.

Целью исследования является расширение спектра математических методов, применяемых при анализе данных в экспериментах, требующих оценки влияния множества факторов на рост количества клеток в изучаемых образцах. Эффективность статистических методов, традиционно применяемых в таких задачах, не подлежит сомнению, однако они могут быть дополнены не статистическими средствами. В их роли выступают описательные методы, визуализация с помощью диаграмм, а также математическое моделирование.

Аналізу подлежали данные, полученные в результате эксперимента по изучению остеоиндуктивных свойств биоконпозитов на основе фиброина шёлка. С помощью клеточного анализатора CellVoyager CQ1 (Yokogawa, Япония) изучались образцы биоконпозита из коллагена с различным содержанием фиброина шелка, на которых от 1 до 7 дней развивались клетки. Образы также различались наличием или отсутствием питательной среды. В качестве контрольной группы выступали образцы из чистого коллагена. В результате анализа на приборе были получены таблицы данных с автоматически распознанными клетками и микрофотографии образцов. Для реализации математических методов и построения диаграмм применялся программный пакет Matlab.

Одним из важных методов визуализации данных, полученных в эксперименте, являются т.н. тепловые карты. Эти диаграммы наглядно описывают пространственное распределение клеток в образце, что не всегда удобно оценивать по микрофотографиям. Тепловые карты позволяют делать различные выводы об исследуемых образцах и о работе анализирующего оборудования, так как карты строятся на основе координат автоматически распознанных прибором клеток. При детальном сравнении микрофотографий с картами было обнаружено, что для некоторых образцов клетки, находящиеся на периферии каждой из микрофотографий, распознавались хуже, чем в центральной области. На картах это выражалось в видимых круговых кластерах, расположенных в узлах неестественно правильной сетки. Дефект мог возникнуть вследствие

неверно подобранных параметров для прибора. Таким образом, тепловые карты могут служить не только для описания образцов, но и для контроля качества измерений.

Для качественного описания системы была применена популяционная модель Мальтуса [1], описывающая рост количества организмов без учёта ограничивающих факторов среды, что применимо к условиям эксперимента. Модель Мальтуса предполагает экспоненциальную зависимость численности клеток от времени. Поэтому, применив экспоненциальную регрессию к данным, удаётся найти показатель роста для каждой из групп образцов. Такой подход позволил получить количественную оценку воздействия фибрина шёлка на рост клеток в образцах. Стоит отметить, что для подтверждения гипотезы необходимо использовать статистические критерии [2]. В данном случае применялся t -критерий Стьюдента.

Изложенные выше методы могут быть приложены к экспериментам, требующим оценку влияния различных факторов на развитие клеток в образцах. Описание изучаемой системы с помощью математической модели для разделения воздействующих факторов уменьшает неопределённость. Это позволяет использовать статистические критерии с большей точностью. Визуализация плотности клеток с помощью тепловых карт может найти применение как при интерпретации результатов эксперимента, так и для обнаружения ошибок автоматического распознавания. Таким образом, предложенные методы дополняют необходимый статистический анализ и повышают точность получаемых результатов.

Список литературы

1. Александров А.Ю., Платонов А.В., Старков В.Н., Степенко Н.А. Математическое моделирование и исследование устойчивости биологических сообществ. 2-е изд. Санкт-Петербург: Лань, 2016. 272 с.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Москва: Практика, 1998. 459 с.

Александровская Н.А. ✉, Нимирицкий П.П., Глазьева В.С., Еремичев Р.Ю., Макаревич П.И.

Клеточные пласты из МСК: прогресс в биоинженерии тканей, управлении процессами регенерации и ангиогенезом

Центр регенеративной медицины МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ n.alexandrushkina@gmail.com

Аннотация. Технология клеточных пластов (КП) представляет собой новую альтернативу для подходов регенеративной медицины, которые требуют воссоздания функциональных тканевых структур. В работе представлены последние достижения в сфере создания перспективных прототипов клеточных продуктов на основе КП.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; клеточные пласты; регенерация; ангиогенез; фиброз.

Alexandrushkina N.A., Nimiritsky P.P., Glazieva V.S., Eremichev R.Yu., Makarevich P.I.

Cell sheets from MSCs: progress in tissue bioengineering, control of regeneration processes and angiogenesis

Center for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Cell sheet (CS) technology represents a new alternative to regenerative medicine approaches used in the development of tissue structures. The paper presents the latest achievements in the field of creating promising prototypes of cellular products based on CS.

Keywords: mesenchymal stromal cells; cell sheets; regeneration; angiogenesis; fibrosis.

Важнейшей целью регенеративной медицины является восстановление функциональной микроархитектуры тканей. Одним из наиболее активно применяемых клеточных типов в этой области являются мезенхимные стромальные клетки (МСК). Хотя инъекция суспензии МСК в поврежденные ткани показала терапевтические преимущества, такие проблемы, как гибель введенных клеток и, как следствие, ограниченная эффективность, препятствуют их широкому клиническому применению. Технология клеточных пластов (КП) представляет собой уникальную способность МСК генерировать трехмерные конструкции, состоящие из культивированных клеток и их депонированного внеклеточного матрикса. Нашим коллективом убедительно показано, что в составе КП МСК обладают более высоким проангиогенным и регенераторным потенциалом. Была установлена способность этих конструкций стимулировать заживление глубоких дефектов кожи и пролежней. Впервые исследовано влияние свойств донора и культуральных характеристик МСК на продолжительность сборки КП. Для прогнозирования времени, необходимого для получения готовой конструкции, предложено измерение длительности лаг-фазы на пассаже, предшествующем сборке КП. Кроме того, в рамках нашей работы мы проанализировали механизмы спонтанной самоорганизации МСК в составе КП. Конденсация МСК в составе КП может рассматриваться как модель самоорганизации клеток при восстановлении микроархитектуры соединительных тканей и органов после повреждения. Было показано, что самоорганизация приводит к формированию пространственно неоднородной плотности клеточной массы, что обеспечивает структурированное распределение клеток с различными свойствами, особенностями профиля транскрипции, метаболическими характеристиками. С помощью секвенирования РНК было выявлено влияние данной неоднородности на паттерн экспрессии генов, что дало возможность изучить эффекты компактизации и предположить потенциальные механизмы, лежащие в их основе. Использование клеточных пластов как гибкой платформы для биоинженерных решений позволяет улучшить качество создаваемых тканеинженерных конструкций, а также расширить их применение в регенеративной

медицине, хирургии и трансплантологии. В свете новых исследований и технологических достижений, КП из МСК демонстрируют значительный практический потенциал в восстановлении функционально полноценной ткани и, следовательно, в улучшении качества жизни пациентов.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Алексеев А.А.^{1,2}, Филимонов К.А.¹, Бобровников А.Э.^{1,2}, Астрелина Т.А.³, Кобзева И.В.³,
Хромина С.С.¹, Сучкова Ю.Б.³

Влияние аутологических клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ ЖТ) на регенерацию сетчатых кожных трансплантатов у больных с обширными ожогами

¹ ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени им. А.И. Бурназяна» ФМБА РФ, Москва, Россия

✉ alexseev@ixv.ru

Аннотация. Проведен анализ эффективности влияния аутологических клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани, в зависимости от способа трансплантации, на регенерацию пересаженных сетчатых ауто трансплантатов с перфорацией 1:6 у пациентов с обширными ожогами.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция; регенеративная медицина; минимально манипулированные клетки; биотехнология; ожоги; аутодермопластика.

Alekseev A.A.^{1,2}, Filimonov K.A.¹, Bobrovnikov A.A.^{1,2}, Astrelina T.A.³, Kobzeva I.V.³, Khromina S.S.¹, Suchkova Y.B.³

Effect of autologous cells of the stromal vascular fraction of adipose tissue (SVF AT) on the regeneration of mesh skin grafts in patients with extensive burns

¹ A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ State Scientific Center of the Russian Federation — Federal Medical Biophysical Center named after A.I. Burnazyan, Moscow, Russia

Abstract. An analysis was conducted of the effectiveness of the influence of autologous cells of the stromal-vascular fraction of adipose tissue, depending on the method of transplantation, on the regeneration of transplanted mesh autografts with 1:6 perforation in patients with extensive burns.

Keywords: stromal vascular fraction; regenerative medicine; minimally manipulated cells; biotechnology; burns; autodermoplasty.

До настоящего времени единственным биотехнологическим методом лечения обширных ожоговых ран с использованием клеток кожи, реализованным в клинической практике, остается комбинированная аутодермопластика с трансплантацией культивированных фибробластов, разработанная в Институте хирургии им. А.В. Вишневского. Несмотря на эффективность, эта методика сегодня имеет ограничения для использования, которые сопряжены с необходимостью культивирования клеток в течение длительного времени, достаточно высокой стоимостью их изготовления, а также с юридическими трудностями применения в широкой клинической практике (ФЗ от 23.06.2016 № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах»).

В настоящее время одним из перспективных научных направлений является изучение возможности и эффективности процессов регенерации и восстановления целостности кожного покрова под влиянием минимально манипулированных аутологических клеток стромально-васкулярной фракции жировой ткани (СВФ ЖТ). Клетки СВФ ЖТ, являются мультипотентными мезенхимальными (стромальными) стволовыми

клетками ADSC (Adipose Derived Stem Cells), характеризуются неоднородностью и значительной вариабельностью клеточного состава. Их регенераторный потенциал обеспечивается за счет многообразия клеточных форм с возможностью высокой степени дифференцировки и пролиферации.

В ходе разработки инновационных методов восстановления кожного покрова у больных с обширными ожогами в ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России проводится сравнение результатов выполнения аутодермопластики кожными трансплантатами с коэффициентом перфорации 1:6 в комбинации с аутологичными клетками СВФ ЖТ в зависимости от способа трансплантации последних: инъекционный, аэрозольный, комбинированный. К настоящему времени в исследование включены 52 пациента. Средний возраст пациентов составил $37,5 \pm 3,6$ лет, общая площадь ожоговых ран в среднем равнялась $46,8 \pm 2,7\%$ поверхности тела (п.т.), площадь глубокого ожога составила $23 \pm 2,7\%$ п.т.

Больные были разделены на 4 группы: 1-я — аутодермопластика с комбинированной (аэрозольной + инъекционной) трансплантацией СВФ ЖТ; 2-я — аутодермопластика с инъекционной трансплантацией СВФ ЖТ; 3-я — аутодермопластика с аэрозольной трансплантацией СВФ ЖТ; 4-я — группа сравнения, стандартная аутодермопластика расщепленными перфорированными трансплантатами с коэффициентом перфорации 1:6.

Трансплантации аутологичных клеток СВФ ЖТ предшествовала шприцевая липосакция с целью забора липоаспирата в объеме от 100 до 200 мл. Полученную жировую ткань, в соответствии с разработанным в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России протоколом, отмывали, проводили ферментативную обработку коллагеназой, центрифугировали и выделяли стромально-вазкулярную фракцию. При выполнении хирургического этапа, после иссечения грануляционной ткани проводилась аутодермопластика трансплантатом с коэффициентами перфорации 1:6 в комбинации с трансплантацией аутологичных клеток СВФ одним из указанных выше способом.

Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что комбинированный метод трансплантации аутологичных клеток СВФ ЖТ (инъекционный + аэрозольный) при лечении пациентов с обширными ожогами является наиболее эффективным, так как на фоне снижения послеоперационных осложнений до 6% (в группе сравнения 27%) возможно добиться начала эпителизации перфорационных ячеек в среднем на $2,8 \pm 1,4$ сутки и полной эпителизации пересаженных трансплантатов в среднем на $9,5 \pm 2,7$ сутки.

Существенным является расширение возможности регенерации аутодермотрансплантатов на площади до 20% поверхности тела одновременно за счет аэрозольного нанесения аутологичных клеток СВФ ЖТ.

Использование комбинированной (инъекционной + аэрозольной) методики трансплантации выделенных аутологичных клеток СВФ жировой ткани в сочетании с аутодермопластикой расщепленным перфорированным кожным трансплантатом с перфорацией в соотношении 1:6 и более обеспечивает максимальную стимуляцию регенеративной функции дериватов кожи пересаженных аутодермотрансплантатов, что обеспечивает эффективное приживание перфорированных аутодермотрансплантатов с сокращением сроков восстановления целостности кожного покрова у пациентов с обширными глубокими ожогами.

Алексеева Н.А.✉, Бойко А.А., Коваленко Е.И.

Повышенный цитотоксический потенциал CX3CR1⁺ НК-клеток в отношении опухолевых сфероидов реализуется даже при низком уровне экспрессии CX3CL1

ФГБУН ГНЦ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН», Москва, Россия

✉ nadalex@inbox.ru

Аннотация. НК-клетки — перспективная основа для противоопухолевых эффекторов. CX3CR1⁺ НК-клетки обладают повышенным тропизмом к сфероидам опухолей молочной железы, экспрессирующим лиганд CX3CR1–CX3CL1, и даже низкий уровень экспрессии CX3CL1 способствует более интенсивной дегрануляции CX3CR1⁺ НК-клеток.

Ключевые слова: НК-клетки; рак молочной железы; опухолевые сфероиды; клеточная терапия; цитотоксичность; CX3CR1; CX3CL1; хемокины.

Alekseeva N.A., Boyko A.A., Kovalenko E.I.

The increased cytotoxic potential of CX3CR1⁺ NK cells towards tumor spheroids is realized even at low levels of CX3CL1 expression

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. NK cells are a promising base for the creation of antitumor effectors. CX3CR1-expressing NK cells have an enhanced tropism for breast tumor spheroids expressing the CX3CR1 ligand CX3CL1, and even low levels of CX3CL1 expression promote more intense degranulation of CX3CR1⁺ NK cells.

Keywords: NK cells; breast cancer; tumor spheroids; cell therapy; cytotoxicity; CX3CR1; CX3CL1; chemokines.

НК-клетки благодаря противоопухолевой активности являются перспективной основой для создания эффекторов клеточной терапии. Тем не менее солидные опухоли, в том числе опухоли молочной железы и яичников, отличаются пониженной восприимчивостью к их воздействию. Молекулы на поверхности опухолевых клеток могут быть как мишенями, повышающими вероятность элиминации опухоли НК-клетками, так и маркерами, ассоциированными с неблагоприятным прогнозом и метастазированием. В случае опухолей молочной железы одной из важнейших осей взаимодействия «рецептор–лиганд» является ось CX3CR1–CX3CL1. Ряд опухолей молочной железы экспрессируют фракталкин CX3CL1, лиганд цитокинового рецептора CX3CR1, и гиперэкспрессия CX3CL1 у HER2⁺ опухолей может быть благоприятным прогностическим фактором [1]. Однако опухолевые клетки также способны приобретать экспрессию CX3CR1, что позволяет им мигрировать в костные ткани и давать начало метастазам [2]. Для повышения эффективности терапии солидных опухолей важен выбор популяции НК-клеток с наибольшим цитотоксическим и миграционным потенциалом. Высокодифференцированные НК-клетки, в том числе с адаптивным фенотипом, отличаются высоким уровнем экспрессии рецептора CX3CR1 и обладают тропизмом к CX3CL1^{pos} опухолям молочной железы и возможным сайтам их метастазирования [3]. Чтобы оценить цитотоксичность CX3CR1⁺ НК-клеток в отношении опухолевых культур с различным уровнем экспрессии лиганда этого рецептора, CX3CL1, мы вырастили 3D-культуры (сфероиды) линий опухолей яичников и молочной железы SKOV-3 (CX3CR1^{neg}), BT-474 (CX3CL1^{low}) и MCF7 (CX3CL1^{high}). НК-клетки, полученные из мононуклеаров крови здоровых добровольцев, активировали *in vitro* IL-2 и фидерными клетками, а затем инкубировали с полученными сфероидами

в течение 24 часов. Цитотоксическую активность CX3CR1⁺ и CX3CR1⁻ НК-клеток оценивали по уровню экспрессии CD107a⁺ на поверхности дегранулировавших клеток методом проточной цитометрии. При инкубации с CX3CL1^{low} и CX3CL1^{high} сфероиды (BT-474 и MCF7 соответственно) на поверхности НК-клеток наблюдался более низкий уровень экспрессии рецептора CX3CR1 по сравнению с НК-клетками, которые инкубировались с CX3CL1^{neg} сфероиды (SKOV-3). Известно, что цитокиновые рецепторы при связывании с лигандами интернализуются, вследствие чего снижается их экспрессия на мембране [4]. Таким образом, снижение уровня экспрессии CX3CR1 свидетельствует об успешном распознавании НК-клетками мишеней с фенотипом CX3CL1^{pos}. Также был оценен уровень экспрессии маркера дегрануляции CD107a на поверхности НК-клеток с фенотипом CX3CR1⁻ и CX3CR1⁺ после инкубации со сфероиды. При инкубации НК-клеток со SKOV-3 между субпопуляциями CX3CR1⁺ и CX3CR1⁻ не было выявлено различий в интенсивности дегрануляции, тогда как CX3CR1⁺ НК-клетки при инкубации со сфероиды BT-474 и MCF7 накапливали больше CD107a на поверхности в сравнении с CX3CR1⁻ НК-клетками. Как CX3CR1⁺, так и CX3CR1⁻ НК-клетки более интенсивно дегранулировали в ответ на инкубацию со сфероиды BT-474 по сравнению со сфероиды MCF7, однако в популяции CX3CR1⁺ различия были более выражены. Таким образом, мы показали, что ось CX3CL1-CX3CR1 может вносить вклад не только в распознавание НК-клетками опухолевых клеток, но и в процесс цитотоксичности даже при низком уровне экспрессии лиганда CX3CL1, однако степень вовлеченности этой оси «рецептор-лиганд» зависит от типа опухоли.

Работа поддержана грантом РФФ №24-75-00160.

Список литературы

1. Dreyer T.F., Kuhn S., Stange C., et al. The chemokine CX3CL1 Improves Trastuzumab efficacy in HER2 low-expressing cancer in vitro and in vivo // *Cancer Immunol Res.* 2021. Vol. 9, N 7. P. 779–789. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0327
2. DiNatale A., Kaur R., Qian C., et al. Subsets of cancer cells expressing CX3CR1 are endowed with metastasis-initiating properties and resistance to chemotherapy // *Oncogene.* 2022. Vol. 41, N 9. P. 1337–1351. doi: 10.1038/s41388-021-02174-w
3. Rebuffet L., Melsen J.E., Escalière B., et al. High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity // *Nat Immunol.* 2024. Vol. 25, N 8. P. 1474–1488. doi: 10.1038/s41590-024-01883-0
4. Neel N.F., Schutyser E., Sai J., et al. Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005. Vol. 16, N 6. P. 637–658. doi: 10.1016/j.cytogfr.2005.05.008

Алексеевко Л.Л. ✉, Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.

Динамика экспрессии генов комплексного ответа на стресс мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека, переживших тепловой шок

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ al.l@mail.ru

Аннотация. Ответ на ТШ в эМСК описывается тремя временными паттернами экспрессии генов: немедленная реакция, активирующая защитные механизмы клетки, отложенная реакция, обеспечивающая восстановление клеточного гомеостаза, и долговременная реакция, отвечающая за индукцию и поддержание клеточного старения.

Ключевые слова: МСК; тепловой стресс; старение; ERS; DDR; HSR; UPR; ERAD.

Alekseenko L.L., Pugovkina N.A., Lyublinskaya O.G.

Dynamics of gene expression of complex stress response of human mesenchymal stem/stromal cells surviving heat shock

Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The response to HS in eMSC is described by three temporal patterns of gene expression: an immediate reaction activating the cell defense mechanisms, a delayed reaction ensuring the restoration of cell homeostasis, and a long-term reaction responsible for the induction and maintenance of senescence.

Keywords: MSC; heat stress; senescence; ERS; DDR; HSR; UPR; ERAD.

Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) являются предметом многочисленных фундаментальных и прикладных исследований вследствие своего высокого терапевтического потенциала и уникальных биологических свойств. Одним из препятствий для развития терапии с использованием МСК является низкая выживаемость клеток после трансплантаций. Этому способствуют окислительный стресс, хроническое воспаление, фиброз, иммунное отторжение и многие другие факторы, сопровождающие развитие патологий, подлежащих коррекции с применением МСК. Температура — важный экзогенный фактор, способный привести к необратимым процессам в жизнедеятельности клеток и всего организма в целом. Динамика и последовательность событий после температурного воздействия мало изучены в контексте комплексного ответа МСК на стресс. Цель настоящего исследования — масштабный мониторинг изменения профиля экспрессии генов мезенхимных стволовых/стромальных клеток эндометрия человека (эМСК), подвергшихся сублетальному температурному воздействию (ТШ) с использованием количественного ПЦР-анализа. В центре внимания — гены комплексного ответа на стресс, а именно: гены белков-шаперонов, гены антиоксидантной защиты, генные модули, активируемые при повреждении ДНК, стрессе эндоплазматического ретикулума, развитии стресс-индуцируемого старения. Для стандартизации протоколов исследования эМСК были синхронизированы при помощи сывороточного голодания. Запуск пролиферации клеток осуществляли путём добавления в среду сыворотки. Прогрев клеток осуществляли при температуре 45°C в течение 30 минут через 16 часов после запуска пролиферации. После стресса клеткам давали возможность восстановиться при 37 °C. Образцы эМСК анализировали в разные временные точки — от минут до 72 часов. Статус пролиферации эМСК оценивали методами проточной цитометрии, иммуноцитохимии и количественного ПЦР-анализа. На начальном этапе нашего исследования мы охарактеризовали физиологическое состояние

эмСК после ТШ. Были отмечены гипертрофия клеток и повышение активности β -галактозидазы, остановка пролиферации, изменение экспрессии ингибиторов циклин-зависимых киназ *P16* и *P21*. Активация транскрипции ингибиторов генов циклин-зависимых киназ *p21* и *p16* не совпала по времени. Усиление экспрессии *P21* было обнаружено через 24 часа, а экспрессия *P16* увеличивается только через 48 часов после прогрева. Транскрипционная активность *P21* и *P16* оставалась на высоком уровне, по крайней мере, в течение 72 часов после ТШ. Данные события свидетельствуют об индукции программы старения в большей части клеточной популяции, однако в минорной её части пролиферация возобновлялась через 72 часа после ТШ. Результаты нашего исследования показали, что ТШ индуцирует появление фокусов γ H2AX — маркеров повреждения ДНК и изменяет профиль экспрессии генов *P53*, *MDM2* и *CHK1* — участников программы DDR (DNA damage-response). Было обнаружено, что при воздействии ТШ в эмСК практически моментально происходит активация транскрипции индуцибельной формы шаперона цитоплазмы *HSP70*. Изменение экспрессии *HSP90* и *HSP27* становится видимой только через 2 часа восстановления. Максимальный уровень экспрессии *HSP70* и *HSP90* был зафиксирован через 2 часа после ТШ и через 48 часов возвращался к уровню непрогретых клеток. Максимальный уровень *HSP27* был обнаружен через 24 часа после прогрева. В отличие от *HSP70* и *HSP90*, экспрессия *HSP27* оставалась высокой в течение 72 часов после ТШ. Было выявлено, что сразу после ТШ в эмСК происходит репрессия транскрипции большинства участников UPR (Unfolded protein response) и ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation), функционирующих в эндоплазматическом ретикулуме. Максимальный пик экспрессии для генов *BiP*, *GP96*, *DNAJC3*, *DNAJC10*, *DNAJB9*, *EDEM1* и *HERPUD1* наступает только через 24 часа восстановления после ТШ. *DNAJC3*, *DNAJC10* и *DNAJB9* имеют разную динамику активации транскрипции, но одновременно возвращается к исходному уровню через 72 часа после воздействия ТШ. Наши данные показали, что ТШ активирует в эмСК IRE1 α — XBP1 путь ERS. Динамика изменения экспрессии гена супероксид-дисмутазы *SOD2* в эмСК сходна с *SOD1* и достигает максимального уровня через 24 после прогрева, однако, в отличие от *SOD1*, уровень *SOD2* остаётся высоким и через 48 ч, и только после этого начинает снижаться. Результаты наших исследований показали, что ответ на ТШ в эмСК описывается тремя временными паттернами экспрессии генов:

- 1) немедленная реакция, активирующая защитные механизмы клетки HSR (Heat shock response) с участием шаперонов цитоплазмы *HSP70*, *HSP90*, временная шкала — несколько часов;
- 2) отложенная реакция, обеспечивающая восстановление клеточного гомеостаза за счёт активации путей DDR, UPR, ERAD и генов антиоксидантной защиты (*GP96*, *BiP*, *EDEM*, *HERPUD1*, *CHK1*, *SOD1*, *SOD2*), временная шкала — 24 часа;
- 3) долговременная реакция, обеспечивающая индукцию и поддержание клеточного старения *P21*, *P16*, *HSP27* и *MDM2*, временная шкала — несколько суток. Исследование было поддержано грантом РФФ №21-74-20178.

Анацкая О.В.¹✉, Пономарцев С.В.¹, Елмуратов А.У.², Харченко М.В.¹, Корнилова Е.С.¹, Виноградов А.Е.¹

Повреждение ДНК, избыточная полиплоидия и признаки ускоренного старения кардиомиоцитов взрослых крыс после перинатальной непереносимости лактозы

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

✉ olga.anatskaya@gmail.com

Аннотация. Данные мРНК секвенирования и морфометрический анализ кардиомиоцитов крыс показали, что неонатальная непереносимость лактозы связана с долговременным повреждением ДНК, старением, полиплоидией, фетализацией сократительных белков и ремоделированием формы по типу делатационной кардиомиопатии.

Ключевые слова: кардиомиоциты; старение; полиплоидия; неонатальное программирование; транскриптомный анализ; непереносимость лактозы.

Anatskaya O.V.¹, Ponomartsev S.V.¹, Elmuratov A.U.², Kharchenko M.V.¹, Kornilova E.S.¹, Vinogradov A.E.¹

DNA Damage, excessive polyploidy, and manifestations of accelerated aging in cardiomyocytes of adult rats after perinatal lactose intolerance

¹ Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Institute of biomedical chemistry, Moscow, Russia

Abstract. The mRNA sequencing data and morphometric analysis of rat cardiomyocytes revealed that neonatal lactose intolerance is associated with long-term DNA damage, aging, polyploidy, fetalization of contractile proteins, and shape remodeling characteristic of dilated cardiomyopathy.

Keywords: cardiomyocytes; aging; polyploidy; neonatal programming; transcriptome analysis; lactose intolerance.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из самых значительных угроз для пожилых людей, поскольку их возникновение тесно связано с возрастом. Именно ССЗ чаще других патологий приводят к инвалидности и преждевременной смерти, что подчеркивает важность нахождения новых факторов повышения риска возникновения ССЗ. Важной особенностью ССЗ, является высокая восприимчивость к неонатальному программированию (НП). Это означает, что условия и факторы, воздействующие на организм в период новорожденности и раннего постнатального роста, могут влиять на дальнейшее развитие и функционирование сердца в течение всей жизни [1–3]. Тесная связь со старением и влияние НП на организм предполагают, что оно может изменять программы развития сердца, тем самым ускоряя процессы старения. Цель данного исследования заключается в анализе долгосрочных эффектов воспалительного стресса, возникающего в результате приобретенной неонатальной непереносимости лактозы (ННЛ), на транскриптом и фенотип кардиомиоцитов. Именно это воздействие мы выбрали потому, что, с одной стороны, ННЛ приводит к повышению концентрации в крови галактозы, которая является лучшим миметиком старения, а также усиливает воспаление, оксидативный стресс и повреждение ДНК, а с другой стороны, потому, что долговременные последствия негенетической ННЛ остаются практически без внимания исследователей и клиницистов. Результаты наших недавних исследований, полученных при исследовании генов, включенных и выключенных при воздействии ННЛ на сердце крыс, показали, что основными триггерами

долговременных изменений является частичное выключение сигнального пути гормона щитовидной железы, кальция и глутатиона, а также активация сигнальных путей, связанных с ответом на повреждение ДНК, воспалением и подавлением некоторых путей иммунитета [3]. Эти изменения сопровождались гиперполиплоидией, которая деконденсирует хроматин и вызывает глобальные изменения транскриптома [4, 5]. В представленном исследовании мы уделили основное внимание изучению генов в полном транскриптоме, которые изменили экспрессию количественно, а не качественно. Также мы оценили ремоделирование формы и сократительных белков кардиомиоцитов. Результаты показывают, что ННЛ приводит к удлинению и сужению кардиомиоцитов, одновременно активируя многочисленные генные пути, связанные с разными типами репарации ДНК и ответом на повреждение ДНК. Также наши данные выявили активацию сигнальных путей, связанных со старением, повреждением ДНК в области теломер, окислительным стрессом, цилиогенезом, ремоделированием хроматина и воспалением. Эти процессы сопровождаются подавлением путей, регулирующих секрецию инсулина, кальциевую сигнализацию и некоторые ветви иммунной системы. Анализ интерактома сократительных белков и иммуногистохимический анализ показали признаки фетализации сократительного аппарата кардиомиоцитов, выражающиеся в замене взрослых изоформ на фетальные для тяжелых цепей миозина. Ключевой вывод нашего исследования состоит в том, что ННЛ может играть важную роль в неонатальном программировании сердечных заболеваний, вызывая патологические изменения в программах развития и ускоряя процессы старения сердца. Полученные данные открывают принципиально новый подход к разработке методов по предотвращению сердечно-сосудистых заболеваний.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28 сентября 2021 г.).

Список литературы

1. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Polyploidy as a fundamental phenomenon in evolution, development, adaptation and diseases // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 7. ID 3542. doi: 10.3390/ijms23073542
2. Анацкая О.В., Виноградов А.Е. Полногеномные дупликации в эволюции, онтогенезе и патологии: резерв сложности и запаса прочности // *Молекулярная биология.* 2021. Т. 55, № 6. С. 927–943. EDN: ZOTTX doi: 10.31857/S0026898421060021
3. Anatskaya O.V., Runov A.L., Ponomartsev S.V., et al. Long-Term Transcriptomic changes and cardiomyocyte hyperpolyploidy after lactose intolerance in neonatal rats // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 8. ID 7063. doi: 10.3390/ijms24087063
4. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Polyploidy promotes hypertranscription, apoptosis resistance, and ciliogenesis in cancer cells and mesenchymal stem cells of various origins: Comparative transcriptome in silico study // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, N 8. ID 4185. doi: 10.3390/ijms25084185
5. Anatskaya O.V., Vinogradov A.E. Polyploidy and Myc proto-oncogenes promote stress adaptation via epigenetic plasticity and gene regulatory network rewiring // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 17. ID 9691. doi: 10.3390/ijms23179691

Анохин Е.В.¹ ✉, Седуш Н.Г.¹, Королев С.В.², Чвалун С.Н.¹

Синтез и исследование поли(L-лактид-со-ε-капролактона) для создания биоразлагаемого мочеточникового стента

¹ ИСПМ РАН им. Н.С. Ениколопова Российской академии наук, Москва, Россия

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

✉ e.anohin@ispm.ru

Аннотация. Синтезирован и комплексно охарактеризован биоразлагаемый биосовместимый полимер поли(L-лактид-со-ε-капролактон) 60:40. Показано, что материал на его основе характеризуется эластичностью и коротким сроком деградации, что делает его перспективным для создания биоразлагаемого мочеточникового стента.

Ключевые слова: мочеточниковый стент; биоразлагаемые полимеры; полилактид.

Anokhin E.V.¹, Sedush N.G.¹, Korolev S.V.², Chvalun S.N.¹

Synthesis and research of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) for the creation of a biodegradable ureteral stent

¹ Enikolopov Institute of Synthetic Polymer Materials of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. A biodegradable and biocompatible polymer, poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) in a 60:40 ratio, was synthesized and comprehensively characterized. It was demonstrated that materials based on this polymer exhibit elasticity and a short degradation period, making it a promising candidate for the development of a biodegradable ureteral stent.

Keywords: ureteral stent; biodegradable polymers; polylactide.

Для поддержания проходимости мочи и ее устойчивого оттока из почек в мочевой пузырь устанавливают мочеточниковые стенты. Их применяют практически после каждой нефрологической процедуры, включая лечение недержания мочи, мочекаменной болезни и трансплантацию почек. Современные мочеточниковые стенты имеют некоторые недостатки, основной из которых связан с необходимостью удаления стента [1]. В связи с этим актуальной задачей является разработка биоразлагаемых мочеточниковых стентов, применение которых позволит исключить необходимость удаления изделия и отдаленные осложнения, характерные для случая «забытого стента» [2]. Мы полагаем, что для изготовления биоразлагаемых мочеточниковых стентов перспективен поли(L-лактид-со-ε-капролактон) (PLCL), поскольку при содержании ε-капролактона ~30% и выше материалы на его основе характеризуются эластичностью и ускоренной деградацией по сравнению с поли(L-лактидом).

Полимер синтезировали методом полимеризации с раскрытием цикла в расплаве при 160 °C и времени 6 ч, концентрация катализатора SnOct₂ составляла 500 ppm, концентрация активатора 1,12-додекандиола составляла 1000 ppm. Очистку полученного полимера проводили методом переосаждения, после чего полимер сушили от остатков растворителя и осадителя в вакуумном шкафу. Полученный полимер характеризуется мономодальным молекулярно-массовым распределением, средневесовой молекулярной массой (M_w) равной 53 кДа и полидисперсностью (PDI) равной 2,2. Синтезированный полимер отвечает требованиям для применения в медицине, поскольку содержание примесей олова не превышает 200 ppm, отклонение от целевого состава LA:CL не превышает 3 моль%, а суммарное остаточное содержание мономеров составляло

менее 2 моль%. Температура стеклования (T_g) равна 6 °С, температура плавления (T_m) составляет 137 °С, энтальпия плавления равна (ΔH_m) 5 Дж/г.

Для изучения физико-механических свойств материала методом экструзии была получена полимерная стренга диаметром 1,25 мм и длиной 50 мм. Испытания на одноосное растяжение проводили при температуре 24 °С и скорости растяжения 10 мм/мин. Установлено, что полученный материал PLCL60:40 характеризуется высокой деформируемостью до 650% и пределом прочности 9 МПа, при этом начальный линейный участок на кривой указывает на упругое поведение материала при небольших деформациях, модуль упругости 90 МПа. Для сравнения были проведены механические испытания коммерчески доступного полиуретанового неразлагаемого стента производства «Cook Medical» (США). Испытания показали, что полиуретановый стент обладает схожими характеристиками: деформация при разрыве 600%, предел прочности 20 МПа, модуль упругости 7 МПа.

Гидролитическую деградацию PLCL60:40 изучали на изотропных пленках толщиной 100 мкм в фосфатном буфере (рН = 7,4) при температуре 37 °С в течение 3 месяцев. По результатам эксперимента по деградации установлено, что снижение молекулярной массы за 14 дней составило 52%. За 30 дней эксперимента молекулярная масса снизилась на 70%. Фрагментация пленки и резкое снижение веса наблюдалась после 50 дней гидролиза. На основании полученных результатов можно прогнозировать, что изделие из разработанного полимера будет сохранять прочность и выполнять свою функцию около 1 месяца, а срок полной деградации составит 3–6 месяцев.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанный материал на основе поли(L-лактид-со-ε-капролактона) 60:40 демонстрирует необходимый комплекс свойств для создания биоразлагаемого мочеточникового стента. В ближайшее время планируется изготовление экспериментальных образцов стентов и проведение исследований на животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание FURG-2023-0069). Исследования методами ДСК и ЯМР-спектроскопии выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования «Центр исследований полимеров» ИСПМ РАН.

Список литературы

1. Hyde J. Design and manufacture of a biodegradable ureteral stent. В кн.: All theses. 2016. ID 2355. Режим доступа: https://open.clemson.edu/all_theses/2355
2. Королёв С.В., Семин А.В., Королёв В.В., и др. Биоразлагаемые мочеточниковые стенты. Аналитический обзор современного состояния проблемы // Вестник последипломного медицинского образования. 2023. № 3. С. 32–38. EDN: AVYVUO

Антипина М.И.✉, Ли В.А., Семина Е.В.

Создание и оценка генетических векторов и клеточных *in vitro* моделей болезни Альцгеймера для решения исследовательских и прикладных задач

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

✉ antipinaria@gmail.com

Аннотация. Болезнь Альцгеймера (БА) — прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, связанное с ухудшением когнитивных способностей. Одним из патологических признаков БА считается накопление агрегатов тау-белка в нейронах головного мозга [1]. Создание и использование адекватных *in vitro* клеточных моделей повысит эффективность скрининга потенциальных препаратов лечения БА [2].

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; тау-белок; MAPT; клеточные модели.

Antipina M.I., Li V.A., Semina E.V.

Creation and evaluation of genetic vectors and *in vitro* cell models of Alzheimer's disease for solving research and applied problems

IKBFU, Kaliningrad, Russia

Abstract. Alzheimer's disease (AD) is a progressive disorder associated with cognitive decline. One of the pathological signs of AD is the accumulation of MAPT in neurons [1]. *In vitro* cell models of the disease are often used to screen potential drugs for AD [2].

Keywords: Alzheimer disease; tau; MAPT; cell models.

На сегодняшний день одной из актуальных и, к сожалению, нерешенных проблем современной медицины является терапия болезни Альцгеймера (БА) — прогрессирующего нейродегенеративного расстройства, связанного с ухудшением когнитивных способностей. Несмотря на то, что механизм развития БА на протяжении десятилетий остается приоритетной задачей для мирового ученого сообщества и многие научные группы избрали своим основным направлением именно поиск причин развития патологии и разработку возможной терапии заболевания, все же первопричина до сих пор остается неизвестной и необходимы дальнейшие исследования. Патологическими признаками заболевания считается накопление β -амилоидного пептида (A β) и ассоциированного с микротрубочками (MAPT) тау-белка в нейронах. Хотя в настоящее время проводится множество клинических исследований, оценивающих эффективность воздействия на A β , есть обоснованные опасения, что его деградации для эффективной терапии может быть недостаточно. Кроме того, ряд исследователей высказывает обоснованное мнение о том, что накопление A β в нейронах скорее следствие патологического процесса, а не его причина. При этом дисфункции тау-белка вследствие его патологического накопления или мутаций в гене достаточно, чтобы вызвать нейродегенерацию в отсутствие патогенного A β [3]. Поэтому активно развиваются препараты поддерживающей терапии, направленные на деградацию MAPT, но для их адекватного и корректного тестирования необходимы подходящие клеточные и животные модели.

Целью работы является создание релевантных клеточных моделей болезни Альцгеймера для тестирования лекарственных препаратов, направленных на специфическую деградацию агрегатов тау-белка.

Для создания клеточных моделей БА нами была выбрана клеточная линия нейробластомы человека SH-SY5Y. Экспрессия мутантного тау-белка будет производиться с помощью эукариотической экспрессионной

кассеты EF1a-TauP301L-hIRES-TdTomatto, где в качестве промотора содержится конститутивный промотор EF1a, а кодирующая последовательность мутантного тау состоит из двух частей TauP301L — гена MAPP, содержащего мутацию, способствующую патологическому образованию агрегатов; и TdTomatto — красного флуоресцентного белка, используемого для валидации экспрессии вектора. Последовательности этих генов разделены сайтом инициации трансляции hIRES. Для сборки эукариотической экспрессионной кассеты EF1a-TauP301L-hIRES-TdTomatto был использован метод субклонирования, совмещенный с протоколом блантинга липких концов для подготовки вектора. Результаты клонирования подтверждены ПЦР-скринингом колоний, рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Для эффективной и конститутивной экспрессии мутантного тау в клетках нейробластомы будет проведена сборка лентивирусных частиц третьего поколения на основе собранной плазмиды. Анализ экспрессии TauP301L в клетках и характеристика агрегатов тау-белка, таких как внутриклеточная локализация, количество и размер агрегатов, а также влияние мутантного белка на клетки, будет проводиться с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии (Zeiss LSM780), масс-спектрометрии (MALDI TOF Bruker autoflex) с ионной ловушкой (BRUKER amaZonSpeed) и вестерн-блоттинга, также будет оценен цитотоксический эффект тау-агрегатов посредством МТТ-теста.

Созданные клеточные модели, экспрессирующие мутантный тау-белок, далее будут использованы для оценки потенциальных препаратов направленной деградации тау-белка как в контексте терапии болезни Альцгеймера, так и других таупатий.

Исследование поддержано из средств программы стратегического академического лидерства «Приоритет 2030» БФУ им. Канта.

Список литературы

1. Cummings J.L., Osse A.M.L., Kinney J.W. Alzheimer's disease: Novel targets and investigational drugs for disease modification // *Drugs*. 2023. Vol. 83, N 15. P. 1387–1408. doi: 10.1007/s40265-023-01938-w
2. Slanzi A., Lannoto G., Rossi B., et al. In vitro models of neurodegenerative diseases // *Front Cell Dev Biol*. 2020. Vol. 8. ID. 328. doi: 10.3389/fcell.2020.00328
3. Karran E., De Strooper B. The amyloid cascade hypothesis: are we poised for success or failure? // *J Neurochem*. 2016. Vol. 139, N S2. P. 237–252. doi: 10.1111/jnc.13632

Антонова Л.В. ✉

Особенности преклинических испытаний тканеинженерных сосудистых протезов с биodeградируемой составляющей: от крыс до приматов

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

✉ antonova.la@mail.ru

Аннотация. Преклинические испытания протезов сосудов малого диаметра выявили, что на модели крысы нельзя получить истинную картину проходимости протезов в силу быстрой эндотелизации. Модель овцы агрессивна в плане тромбообразования и ускоренной биорезорбции полимеров. Наилучшие результаты получены после имплантации протезов павианам.

Ключевые слова: тканевая инженерия; протез сосуда малого диаметра; преклинические испытания.

Antonova L.V.

Features of preclinical testing of tissue-engineered vascular prostheses with a biodegradable component: from rats to primates

Research Institute of Complex Issue of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract. Preclinical tests of prosthetic vessels of small diameter revealed that it is impossible to obtain a true picture of the patency of prostheses on a rat model due to rapid endothelization. The sheep model is aggressive in terms of thrombosis and accelerated polymer bioresorption. The best results were obtained after implantation of prostheses to baboons.

Keywords: tissue engineering; small diameter vessel prosthesis; preclinical tests.

Сосудистые протезы малого диаметра классифицируются как медицинские изделия с высокой степенью риска, относясь к третьему классу. Поэтому к данному виду изделий предъявляются самые высокие требования как в части биосовместимости, так и в плане долгосрочной эффективности. После получения на этапе *in vitro* доказательств соответствия разработанного изделия требуемому уровню биосовместимости и безопасности исследователи переходят к преклиническим испытаниям прототипов изделия на животной модели. Именно результаты преклинических испытаний являются основополагающими, так как позволяют в условиях целостного организма оценить биосовместимость и эффективность разработанной конструкции. Полнота определения рисков несостоятельности биodeградируемых сосудистых протезов малого диаметра, подвергаемых преклиническим испытаниям, напрямую зависит от животной модели, выбранной для проведения подобных испытаний.

Наш опыт показывает, что модель крысы, несмотря на полученные положительные результаты высокой проходимости протезов спустя 12 месяцев после имплантации в брюшную часть аорты крыс, не позволяет спроецировать истинную картину долгосрочной проходимости сосудистых протезов на человека в силу склонности крыс к быстрой эндотелизации, невозможности имплантировать длинные протезы в аорту крыс, а также видовой удаленности крысиной модели от человеческой. При этом модель крысы хороша в плане оценки подверженности сосудистых протезов к кальцификации [1].

Модель овцы оказалась весьма агрессивна в плане склонности к тромбообразованию, что привело к необходимости изменения технологии изготовления сосудистого протеза в направлении усиления атромбогенных свойств, что позволило повысить процент проходимых протезов с 0% до 50,0% спустя 18 месяцев

имплантации в сонные артерии овец [2, 3]. Однако только на данной модели выявлен факт ускоренной биодеградации полимеров, повлекший формирование аневризм в стенках протезов на всем протяжении. Спустя 6 месяцев имплантации просвет протезов увеличился с 4,0 мм до 2,2 см вследствие активной резорбции основного биодеградируемого каркаса, хотя целый ряд литературных источников гласит, что использованные нами полимеры не должны резорбироваться быстрее 3 лет.

Также обращает на себя внимание, что несмотря на описанную агрессивность модели овцы в плане кальцификации, ограниченный очаг кальция выявлен лишь в одном из восьми протезов, имплантированных в сонные артерии овец.

Модель приматов, на наш взгляд, явилась самой сбалансированной в плане долгосрочной проходимости и ремоделирования. Итоговая проходимость сосудистых протезов диаметром 3,0–3,5 мм длиной 3,0–4,5 см на фоне стандартной послеоперационной антитромбоцитарной терапии составила 83,3% (5 из 6) спустя 6 месяцев имплантации в бедренную артерию павианов. Ранний тромбоз одного протеза случился у павиана с сопутствующей патологией (избыточная масса тела, в 2 раза превысившая возрастную норму; дыхательная недостаточность). При морфологическом исследовании эксплантированных образцов протезов выявлены полноценная эндотелизация внутренней поверхности протезов на всем протяжении, неинтима без признаков гиперплазии, неоадвентиция, а также миграция клеточных элементов в толщу стенок протезов с отложением коллагена I и IV типа. Проявления воспаления и кальцификации отсутствовали. Для приматов подошли человеческие флуоресцентные антитела, что расширило возможности иммунофлуоресцентного анализа эксплантированных образцов, поскольку панели антител для человека гораздо шире, чем для любой животной модели.

Результаты получены при поддержке Российской Федерации в лице Министерства науки и высшего образования РФ в рамках Соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидий от 30 сентября 2022 г. № 075-15-2022-1202, комплексной научно-технической программы полного инновационного цикла «Разработка и внедрение комплекса технологий в областях разведки и добычи твердых полезных ископаемых, обеспечения промышленной безопасности, биоремедиации, создания новых продуктов глубокой переработки из угольного сырья при последовательном снижении экологической нагрузки на окружающую среду и рисков для жизни населения» (утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 11 мая 2022 г. № 1144-р).

Список литературы

1. Antonova L.V., Sevostyanova V.V., Mironov A.V., et al. In situ vascular tissue remodeling using biodegradable tubular scaffolds with incorporated growth factors and chemoattractant molecules // *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний*. 2018. Т. 7, № 2. С. 25–36. EDN: UUVYK doi: 10.17802/2306-1278-2018-7-2-25-36
2. Груздева О.В., Бычкова Е.Е., Пенская Т.Ю., и др. Сравнительная характеристика гемостазиологического профиля овец и пациентов с сердечно-сосудистой патологией — основа для прогнозирования тромботических рисков в ходе преклинических испытаний сосудистых протезов // *Современные технологии в медицине*. 2021. Т. 13, № 1. С. 52–58. EDN: TJKDPF doi: 10.17691/stm2021.13.1.06
3. Antonova L.V., Krivkina E.O., Sevostianova V.V., et al. Tissue-engineered carotid artery interposition grafts demonstrate high primary patency and promote vascular tissue regeneration in the ovine model // *Polymers*. 2021. Vol. 13, N 16. ID 2637. doi: 10.3390/polym13162637

Антропова И.П.^{1,2} ✉, Александрова А.Д.^{1,2}, Волокитина Е.А.¹, Кутепов С.М.¹

Влияние блокирования P2Y₁₂ рецепторов тромбоцитов на регенерацию

¹ ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Минздрава РФ, Екатеринбург, Россия

² ФГБУН Институт иммунологии и физиологии УрО РАН, Екатеринбург, Россия

✉ aip.hemolab@mail.ru

Аннотация. Проведено изучение влияния блокирования АДФ-рецепторов P2Y₁₂ тромбоцитов клопидогрелом на процесс репаративного остеогенеза в условиях экспериментальной травмы. Показано, что снижение функциональной активности тромбоцитов оказывает существенное влияние на репаративную регенерацию костной ткани.

Ключевые слова: тромбоциты; блокирование P2Y₁₂ рецепторов; клопидогрел; кость; травма; репаративная регенерация; эксперимент.

Antropova I.P.^{1,2}, Aleksandrova A.D.^{1,2}, Volokitina E.A.¹, Kutepov S.M.¹

Effect of platelet P2Y₁₂ receptor blockade on bone regeneration

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia

² Federal State Budgetary Scientific Institution Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Abstract. The effect of platelets ADP P2Y₁₂ receptors blockade with clopidogrel on reparative osteogenesis under experimental trauma conditions was studied. It was shown that a decrease in the functional activity of platelets has a significant effect on reparative regeneration of bone tissue.

Keywords: platelets; P2Y₁₂ receptor blockade; clopidogrel; bone tissue; trauma; reparative regeneration; experiment.

Важной задачей в травматологии и ортопедии является разработка оптимальных биологических продуктов и технологий, стимулирующих процессы остеоинтеграции и повышающих качество периимплантной костной ткани. Проблема применения биологических материалов на основе тромбоцитов в последнее время приобрела беспрецедентное внимание в регенеративной медицине [1]. Однако результаты исследований неоднозначны [2], что в значительной степени связано с недостаточной изученностью механизмов участия тромбоцитов в процессе репаративного остеогенеза. Это обуславливает актуальность изучения влияния морфофункциональных особенностей тромбоцитов на процесс репарации костной ткани. Целью работы стала оценка влияния блокирования АДФ-рецепторов P2Y₁₂ тромбоцитов клопидогрелом на процесс репаративного остеогенеза в условиях экспериментальной травмы.

Объект исследования — белые крысы линии Wistar в возрасте 6 месяцев. Животным опытной группы ($n = 18$) осуществлялось подавление функциональной активности тромбоцитов антиагрегантным препаратом клопидогрел (перорально, 30 мг/кг веса) в течение 7 суток до операции и после хирургического вмешательства до выведения животных из эксперимента. В контрольной группе ($n = 18$) введение антиагреганта не проводилось. Моделирование хирургической травмы кости — сквозное круглое отверстие в области латерального надмыщелка бедренной кости диаметром 2 мм. Выведение из эксперимента животных контрольной и опытной групп проводили непосредственно перед операцией (0 суток), через 4 и 10 недель после операции ($n = 6$ на каждую временную точку). При выведении из эксперимента у животных под общим ингаляционным эфирным наркозом прижизненно отбирали кровь методом пункции сердца. Процедуру

завершали эвтаназией 0,5% раствором новокаина. Для определения количества тромбоцитов использовали автоматический гематологический анализатор «MEDONIC M20», функциональную активность тромбоцитов определяли с использованием лазерного анализатора агрегации тромбоцитов Алат-2 «Биола». Параметры АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и средний размер агрегатов определяли по Борну. Проводился гистологический анализ травмированного участка кости. Образцы после фиксации в 10% забуференном формалине промывали и декальцинировали, после чего делались срезы толщиной 2–3 мм, которые были проведены по спиртам повышающейся концентрации и залиты в парафин. Парафиновые блоки нарезали на ротационном микротоме Thermo Scientific HM-340E. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Гистологическое и морфометрическое исследование осуществлялось при помощи микроскопа Olympus CX-41, камеры Levenhuk M1000 PLUS. Измерения проводились в программе Phenix Phmias 3.0.6731. Полученные измерения подвергались статистической обработке в программных пакетах EZR 1.41 и Statistica. Работа одобрена локальным этическим комитетом УГМУ.

Анализ функциональной активности тромбоцитов показал, что в контрольной группе животных АДФ индуцировал выраженную агрегацию тромбоцитов с формированием крупных агрегатов. В опытной группе на фоне введения клопидогрела агрегационная функция тромбоцитов была существенно снижена как до, так и после операции. Значения максимальной агрегации и максимального размера тромбоцитарных агрегатов на фоне применения клопидогрела были существенно ниже, чем в контроле в течение всего периода исследования. Количество тромбоцитов в опытной группе было значительно выше, но относительное количество крупных тромбоцитов (R-LCR) существенно ниже, чем в контрольной группе.

Гистологическое сравнение морфологических особенностей регенерата костной ткани показало, что площадь костной ткани через 4 недели после операции в абсолютном и относительном выражении была существенно меньше в образцах опытной группы по сравнению с контрольной, к 10-й послеоперационной неделе различия между группами по данным показателям в значительной мере нивелировались. В то же время средняя толщина костных трабекул была существенно ниже в опытной группе как через 4, так и через 10 недель после операции, что свидетельствует о менее эффективной репаративной регенерации.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что снижение функциональной активности тромбоцитов посредством блокирования $P2Y_{12}$ рецепторов приводит к их количественным и качественным изменениям, которые сохраняются в условиях травмы и оказывают существенное влияние на качество репаративной регенерации костной ткани.

Список литературы

1. Zhu L., Li P., Qin Y., et al. Platelet-rich plasma in orthopedics: Bridging innovation and clinical applications for bone repair // *J Orthop Surg (Hong Kong)*. 2024. Vol. 32, N 1. ID 10225536231224952. doi: 10.1177/10225536231224952
2. Bacevich B.M., Smith R.D.J., Reihl A.M., et al. Advances with platelet-rich plasma for bone healing // *Biologics*. 2024. Vol. 18. P. 29–59. doi: 10.2147/BTT.S290341

Арзуманянц Е.В.¹ ✉, Перова Н.В.¹, Севастьянов В.И.^{1,2}

Отрицательные показатели санитарно-химических исследований медицинских изделий и биоматериалов при положительных результатах биологических испытаний: артефакт или руководство к действию

¹ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

✉ elenaimbiit@mail.ru

Аннотация. Рассмотрены примеры и предложен алгоритм действия, при которых положительные результаты биологических испытаний материалов для медицинских изделий получены при содержании токсичных веществ в экстрактах из объектов исследования, превышающих предельно допустимые концентрации.

Ключевые слова: биоматериалы; токсикологические испытания; биобезопасность.

Arzumanyants E.V.¹, Perova N.V.¹, Sevastianov V.I.^{1,2}

Negative indicators of chemical studies of biomaterials with positive results of biological tests: an artifact or a guide to action

¹ ANO "Institute of Biomedical Research and Technology", Moscow, Russia

² Shumakov National Medical Research Center for Transplantology and Artificial Organs of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Examples are considered and an algorithm of action is proposed in which positive results of biological studies of materials for medical devices are obtained when the content of toxic substances in extracts from the objects of study exceeds the maximum permissible concentrations.

Keywords: biomaterial; toxicological studies; biological safety.

Санитарно-химические испытания являются первым этапом доклинических токсикологических исследований медицинских изделий и материалов (далее — МИ) [1], в которых в экстракте из исследуемого образца оценивается химическая опасность веществ. Отрицательные результаты этих испытаний могут быть основанием для прекращения дальнейших исследований из-за высвобождения из состава материала опасных (токсичных) веществ в количествах, превышающих предельно допустимые значения (ПДК). Кроме того, полученные результаты позволяют дать рекомендации о внесении определенных изменений в подбор материалов для МИ и/или технологических процессов (включая способы и режимы стерилизации) для снижения концентрации токсичных веществ до требуемого уровня. Вторым этапом установления безопасности МИ является проведение биологических исследований и делается заключение о соответствии или несоответствии МИ требованиям, предъявляемым к безопасности МИ. Тогда как санитарно-химические испытания с привлечением методов исследования физико-химических свойств материалов, входящих в состав МИ, предназначены для ответа на вопрос, в чем причина обнаруженного отрицательного биологического действия МИ.

Объектами исследования были: элемент устройства для отбора биоткани с последующим ее введением пациенту (МИ 1); внутридермальный имплантат на основе гиалуроновой кислоты (МИ 2). Исходя из состава материалов МИ 1 и МИ 2, для измерения концентрации опасных химических веществ, мигрирующих

в модельные среды, использовали следующие методы: газовая хроматография, спектрофотометрия, атомно-абсорбционная спектрометрия, рН-метрия, осмометрия и титриметрический анализ. При исследовании биологической безопасности (токсичности) МИ 1 определяли цитотоксичность, пирогенность, внутрикожное раздражающее действие, сенсибилизирующее действие, а для МИ 2 дополнительно оценивали острую токсичность и местное действие при подкожной имплантации.

При санитарно-химических исследованиях водных экстрактов материалов, входящих в состав МИ 1, установлено, что содержание формальдегида в экстракте ($0,28 \pm 0,06$ мг/дм³) выше предельно допустимой концентрации (ПДК), равной $0,100$ мг/дм³. Источником загрязнения МИ 1 формальдегидом оказалось уплотнительное кольцо поршня из силикона. При замене полимерного материала уплотнительного кольца содержание формальдегида в экстракте уменьшилось до допустимых значений. Для внутридермального имплантата было выявлено значительное превышение изопропанола в водных экстрактах ($2,27 \pm 0,61$ мг/дм³) при допустимом значении $0,100$ мг/дм³, причиной которого была гиалуроновая кислота. В то же время результаты токсикологических испытаний *in vitro* и *in vivo* показали, что оба МИ по исследуемым показателям биологической безопасности соответствуют требованиям, предъявляемым к МИ. Отсутствие отрицательного влияния токсичных примесей на биологическую безопасность МИ в обоих случаях можно объяснить так называемым накопительным или отложенным эффектом. А именно, токсическое действие опасных веществ проявляется на более поздних сроках функционирования МИ по сравнению с продолжительностью доклинических испытаний *in vitro* и *in vivo*, при которых была установлена его биологическая безопасность. Санитарно-химические исследования позволяют не только идентифицировать представляющие токсикологическую опасность вещества, содержание которых в экстракте превышает ПДК, но и их локализацию в МИ. Особое внимание для обеспечения биологической безопасности МИ следует обратить на химическую чистоту и состав исходных компонентов (сырья).

Возможны две причины получения положительных результатов биологических исследований при сохранении одного или нескольких токсичных веществ в экстрактах МИ, превышающих ПДК:

1) рекомендованные стандартом ГОСТ Р 52770-2023 значения ПДК [2], большая часть которых взяты из санитарной химии окружающей среды и продуктов питания без анализа их применимости для МИ, могут быть невыполнимы;

2) отсутствие отрицательного влияния токсичных примесей на биологическую безопасность МИ можно объяснить накопительным или отложенным эффектом. Токсичность веществ проявляется на более поздних сроках функционирования МИ по сравнению с продолжительностью доклинических испытаний *in vitro* и *in vivo*, при которых была установлена его биологическая безопасность.

В первом случае разработчику необходимо провести новую серию экспериментов, подтверждающих биологическую безопасность МИ в соответствии с положениями стандартов серии ГОСТ ISO 10993, и внести соответствующие изменения в техническую документацию. Заметим, что в случае промышленного выпуска МИ ответственность за выполнение требований стандарта ГОСТ ISO 10993 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий» возложена на производителей МИ.

Во втором случае, который наиболее вероятен для МИ многократного применения для одного пациента, необходимо устранить источник/причину обнаруженного превышения ПДК токсичных веществ с повторным проведением биологических исследований.

Список литературы

1. Севастьянов В.И., Перова Н.В., Арзуманянц Е.В., и др. Оценка биологической безопасности медицинских изделий (аналитический обзор) // Перспективные материалы. 2024. № 4. С. 17–30. EDN: TIRLDY doi: 10.30791/1028-978X-2024-4-17-30
2. ГОСТ Р 52770-2023. Изделия медицинские. Система оценки биологического действия. Общие требования безопасности. Москва: Российский институт стандартизации, 2024 г.

Арссан М.А.✉, Шевченко А.И., Захарова И.С.

На пути к совершенству: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека и возможность воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ arsanmhdamin@yandex.ru

Аннотация. Показано, что способность наивных плюрипотентных клеток человека воспроизводить случайную инактивацию X-хромосомы зависит от доли клеток, близких к тотипотентному состоянию. Полученные результаты помогут совершенствованию подходов к поддержанию наивных плюрипотентных стволовых клеток человека.

Ключевые слова: наивные плюрипотентные стволовые клетки человека; инактивация X-хромосомы.

Arssan M.A., Shevchenko A.I., Zakharova I.S.

Toward perfection — naive pluripotent stem cells and recapitulating random X chromosome inactivation

The Federal Research Center Institute of cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. We have shown that the ability of naïve human pluripotent cells to reproduce random X-chromosome inactivation depends on the proportion of cells close to the totipotent state. Our results may help to improve approaches to maintaining naïve human pluripotent stem cells.

Keywords: naïve human pluripotent stem cells; X-chromosome inactivation.

Наивные плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) в последнее десятилетие стали бесценным инструментом для биомедицинских исследований. Они эквивалентны преимплантационным бластомерам эпибласта, и обладают широким потенциалом дифференцировки в эмбриональные и экстраэмбриональные производные. При определенных условиях наивные ПСК в ходе дифференцировки могут воспроизводить процесс инактивации X-хромосомы, однако он происходит неслучайным образом и приводит к преимущественной инактивации X-хромосомы, которая была неактивна в клетках ранее — до их перевода в наивное состояние. В результате этого широкое использование огромного потенциала наивных ПСК ограничено, что инициирует работы по совершенствованию условий их получения и поддержания. В этом исследовании мы оценили возможность реализации случайной инактивации X-хромосомы (rXCI) в наивных эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), культивируемых в трёх модификациях среды HENSM. Используя три среды: HENSM+LA (с LIF и Activin A), HENSM+L (с LIF) и базовую HENSM без факторов, мы переводили праймированные ЭСК HuES9 в наивное состояние. Полученные культуры демонстрировали сфероподобную морфологию, характерную для наивной плюрипотентности, и повышенную экспрессию связанных с наивной плюрипотентностью транскрипционных факторов, таких как TFCP2L1, KLF17 и DNMT3L. В наивной культуре, полученной в среде HENSM без факторов, экспрессия генов тотипотентного состояния LUETX, TPRX1 и ZSCAN4 была достоверно выше по сравнению с другими наивными культурами, полученными в той же среде в присутствии LIF и Activin A. Кроме того, мы обнаружили, что увеличение уровня экспрессии маркеров тотипотентности способствует запуску rXCI при возврате наивных клеток обратно в праймированное состояние. Таким образом, наличие

факторов роста в среде HENSM усиливает плюрипотентность, а их отсутствие приводит наивные клетки к более ранним стадиям эмбрионального развития, близким к тотипотентному состоянию. Более того, наивные ПСК человека, поддерживаемые в среде HENSM без факторов роста, обладают большим потенциалом для запуска гХСІ. При этом вероятность гХСІ в культурах hiES9, культивируемых на средах HENSM, возрастает пропорционально доле клеток, экспрессирующих маркеры, уникальные для тотипотентности. Можно предположить, что инициация гХСІ у человека происходит в клетках, близких к тотипотентному состоянию. Полученные результаты будут способствовать совершенствованию подходов к получению и поддержанию наивных плюрипотентных стволовых клеток человека, что, в свою очередь, позволит более широко использовать их уникальные характеристики в биомедицинских исследованиях.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 24-15-00346.

Астрелина Т.А.✉, Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А., Михадаркина О.Г., Маливанова Т.Ф., Самойлов А.С.

Биомедицинские технологии при лечении местных радиационных поражений

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

✉ t_astrelina@mail.ru

Аннотация. Одним из наиболее распространенных видов радиационных повреждений являются радиационные ожоги — местные лучевые поражения (МЛП). Применение клеточных технологий является актуальным для лечения МЛП. Показана высокая эффективность и безопасность применения клеточных технологий при лечении МЛП.

Ключевые слова: местные лучевые поражения; радиационные поражения; клеточные технологии.

Astrelina T.A., Kobzeva I.V., Suchkova Yu.B., Nikitina V.A., Usupzhanova D.Yu., Brunchukov V.A., Mikhadarkina O.G., Malivanova T.F., Samoilov A.S.

Biomedical technologies in the treatment of local radiation injuries

State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. One of the most common types of radiation damage is radiation burns — local radiation injuries (LRI). The use of cellular technologies is relevant for the treatment of LRI. High efficiency and safety of the use of cellular technologies in the treatment of LRI have been demonstrated.

Keywords: local radiation injuries; radiation injuries; cellular technologies.

Одним из наиболее распространенных видов радиационных повреждений при воздействии ионизирующего излучения на человека являются радиационные ожоги — тяжелые местные лучевые поражения (МЛП). МЛП кожи часто встречаются при радиационных авариях и инцидентах с источниками ионизирующих излучений. Многочисленные исследования показали, что изменения кожи вследствие радиационного поражения в ранний период возникают из-за генетических повреждений стволовых и пролиферирующих клеток эпидермиса и снижения репаративных процессов. Повреждение менее радиочувствительных клеточных и тканевых элементов: эндотелия сосудов, фибробластов, эластичной и гладкомышечной оболочек — также имеет важное значение. Большая вероятность появления поздних лучевых осложнений, развивающихся спустя 6 и более месяцев после периода видимого восстановления, является характерной особенностью клинического течения МЛП. Самостоятельное клиническое значение имеет развитие МЛП при лучевой терапии онкологических заболеваний. МЛП занимают одно из первых мест среди осложнений лучевой терапии и составляют 20–40% от всех осложнений.

МЛП очень трудно поддаются лечению, консервативные методы лечения незаживающих хронических лучевых язв являются малоэффективными, и нередко требуется хирургическое вмешательство, которое не всегда возможно из-за состояния организма. Одним из перспективных методов лечения МЛП на сегодняшний день является применение клеточной терапии в комплексной терапии.

Успешное применение биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) из мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в комплексной терапии МЛП обусловлено в основном их секреторной активностью, связанной с выработкой ими широкого спектра цитокинов и ростовых факторов. Помимо этого, МСК обладают иммуносупрессивным, противовоспалительным и трофическим действием. Исследования на лабораторных животных в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России показали, что применение МСК костного

мозга, слизистой ткани десны, концентрата кондиционированных сред МСК плаценты улучшает течение МЛП кожи (уменьшение фиброза, улучшение организации коллагена) и ускорение заживления. Показанная клиническая эффективность применения стволовых клеток связана с паракринными факторами, которые секретируются в межклеточное пространство в процессе культивирования стволовых клеток, а не с клетками.

В настоящее время активно применяется жировая ткань в клинической практике. Эффект действия регенеративных клеток жировой ткани реализуется за счет дифференцировки их в различные направления и замещения поврежденных участков тканей, выработки паракринных факторов, обеспечивающих иммуномодулирующий эффект, предотвращение клеточной гибели по механизму апоптоза, неоангиогенеза, ремоделирование фиброзной и соединительной тканей. Исследования в ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России показали на лабораторных животных, что применение регенеративных клеток жировой ткани улучшает течение МЛП кожи, ускоряет процессы заживления ран за счет улучшения неоангиогенеза и усиления пролиферации фибробластов после локального рентгеновского облучения; у пациентов с МЛП, что применение СВФ ЖТ обеспечивает благоприятные условия для повышения эффективности комплексной терапии, сокращение сроков заживления раневой поверхности, регуляцию и активацию иммунных и репаративных процессов в дерме, восстановление поврежденной сосудистой сети, утраченных кожных покровов без грубых рубцовых изменений, заживление и достижение удовлетворительного результата, достойного качества жизни пациентов. Все это указывает на возможность успешного применения клеток жировой ткани при тяжелых местных радиационных поражениях.

Таким образом, применение клеточных технологий является актуальным для лечения местных лучевых поражений за счет эффективности и улучшения качества жизни пациентов. Наиболее перспективными для клинического применения являются аутологичные регенеративные клетки жировой ткани, которые обладают способностью к дифференцировке в различных направлениях, а также секретируют огромный спектр цитокинов и факторов роста, играющих важную роль в регенерации ткани. Продемонстрирована высокая эффективность и безопасность применения аутологичных регенеративных клеток жировой ткани при лечении тяжелых МЛП.

Список литературы

1. Brunchukov V., Astrelina T., Usupzhanova D., et al. Evaluation of the effectiveness of mesenchymal stem cells of the placenta and their conditioned medium in local radiation injuries. В кн.: Stem Cells and Irradiation / A. Chapel, editor. Basel – Beijing – Wuhan – Barcelona – Belgrade – Manchester – Tokyo – Cluj – Tianjin: MDPI Books IRSN, 2023.
2. Дешевой Ю.Б., Лебедев В.Г., Насонова Т.А., и др. Сравнительная эффективность сингенных культивированных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) и свежeweделенных клеток стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани при лечении тяжелых местных лучевых поражений в эксперименте // Радиационная биология. Радиоэкология. 2021. Т. 61, № 2. С. 151–157. EDN: VILLW doi: 10.31857/S0869803121020065

Атаманова А.А.¹ ✉, Седуш Н.Г.¹, Королев В.В.², Чвалун С.Н.¹

Биоразлагаемые полимеры на основе лактида, гликолида и ε-капролактона для регенеративной медицины

¹ Институт синтетических полимерных материалов имени Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

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

✉ a.atamanova@ispm.ru

Аннотация. В работе описана серия биоразлагаемых полимеров на основе L-лактида, D,L-лактида, гликолида и ε-капролактона с различным составом и сроком деградации. Синтезированные полимеры характеризуются высокой чистотой и могут быть использованы для создания каркасов в тканеинженерных конструкциях.

Ключевые слова: биоразлагаемые полимеры; скаффолды; полилактид; поли(лактид-ко-гликолид); тканевая инженерия; поли(ε-капролактон).

Atamanova A.A.¹, Sedush N.G.¹, Korolev V.V.², Chvalun S.N.¹

Biodegradable polymers based on lactide, glycolide and ε-caprolactone for regenerative medicine

¹ Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. We report a series of biodegradable polymers based on L-lactide, D,L-lactide, glycolide and ε-caprolactone with different composition and degradation time. The synthesized polymers are characterized by high purity and can be used to create scaffolds for tissue engineering products.

Keywords: biodegradable polymers; scaffolds; polylactide; poly(lactide-co-glycolide); tissue engineering; poly(ε-caprolactone).

Создание новых биомедицинских материалов кардинально меняет подходы к лечению, делая медицину более эффективной, безопасной и персонализированной для каждого пациента. Ключевую роль в развитии регенеративной медицины играют синтетические биоразлагаемые полимеры, которые используются для изготовления каркасов и скаффолдов, в биопечати и др. В частности, на основе сложных полиэфиров, таких как полилактид, полигликолид, поли(ε-капролактон) и их сополимеров, с помощью различных методов получают пористые биоразлагаемые скаффолды для различных тканеинженерных конструкций. При этом полимер выбирают так, чтобы профиль деградации скаффолда был близок к скорости формирования новой ткани, обеспечивая постепенное замещение каркаса тканью [1].

В этой связи важной задачей является получение биоразлагаемых полиэфиров с контролируемым молекулярным строением и надмолекулярной организацией, т.к. именно эти параметры определяют физико-химические и функциональные свойства материалов, а также скорость их разложения в организме. Медленно разлагающиеся полиэфиры, такие как поли(ε-капролактон), обеспечивают длительную поддержку растущей ткани, тогда как более быстро разлагающиеся материалы на основе сополимеров лактида и гликолида подходят для инженерии тканей, требующих кратковременно функционирующего каркаса. Это важно для предотвращения преждевременного разрушения скаффолда, который может негативно повлиять на процесс регенерации [2].

Поэтому актуальной задачей является разработка методов контролируемого синтеза ряда биоразлагаемых полиэфиров с контролируемым составом и высокой чистотой, характеристики которых отвечают требованиям стандартов для применений в медицине и фармацевтике. В рамках данной работы были синтезированы и исследованы поли(D,L-лактид-ко-гликолид) 50/50, поли(D,L-лактид-ко-гликолид) 75/25, поли(L-лактид-ко-гликолид) 75/25, поли(ϵ -капролактон). Полимеризацию с раскрытием цикла проводили в расплаве при температуре 160 °С с использованием 2-этилгексаноата олова ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$) в качестве катализатора и 1,12-додекандиола в качестве активатора. Степень конверсии мономеров и состав полимеров рассчитывали методом ^1H -ЯМР спектроскопии. Показано, что при оптимальном времени реакции максимальная степень конверсии для полученных полимеров составляла от 96 до 99%, а отклонение от заданного состава сополимеров не превышало 1%, что соответствует требованиям стандартов. Для исследования гидролитической деградации поли(D,L-лактид-ко-гликолид) 50/50 методом горячего прессования получали изотропные пленки и инкубировали их в фосфатном буфере ($\text{pH} = 7,4$) при температуре 37°C в течение одного месяца. Показано, что снижение молекулярной массы за 7 дней составило 68%, а через 28 дней эксперимента происходило полное разрушение образца и снижение молекулярной массы на 94%. Данный полимер характеризуется наиболее высокой скоростью деградации, поскольку содержит больше всего звеньев гликолида. Уменьшение доли звеньев гликолида, а также замена D,L-изомера лактида на L-лактид в составе полимера приводит к замедлению деградации. При содержании L-лактида в сополимере 75% и выше блоки полилактида в составе сополимера могут кристаллизоваться, что затрудняет диффузию воды в материал и замедляет процесс гидролитической деградации. В целом срок деградации повышается в ряду: поли(D,L-лактид-ко-гликолид) 50/50 < поли(D,L-лактид-ко-гликолид) 75/25 < поли(L-лактид-ко-гликолид) 75/25 < поли(ϵ -капролактон). Таким образом, синтезированные полимеры характеризуются высокой чистотой и контролируемым сроком деградации и могут быть использованы для создания тканеинженерных конструкций, в технологиях биопечати, для создания лекарственных препаратов пролонгированного действия и медицинских изделий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (госзадание FURG-2023-0069).

Список литературы

1. Гомзяк В.И., Демина В.А., Разуваева Е.В., и др. Биоразлагаемые полимерные материалы для медицины: от импланта к органу // Тонкие химические технологии. 2017. Т. 12, № 5. С. 5–20. EDN: ZSJRZP doi: 10.32362/2410-6593-2017-12-5-5-20
2. Jain R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-coglycolide) (PLGA) devices // Biomaterials. 2000. Vol. 21, N 23. P. 2475–2490. doi: 10.1016/S0142-9612(00)00115-0

Бабарико Д.В. ✉, Даниленко О.В., Шингель А.М., Сяхович В.Э., Бакакина Ю.С., Походня Ю.Г.

Получение сфероидов *in vitro* на основе клеток печени человека с использованием ротационного биореактора с целью изучения метаболизма андрогенных анаболических стероидов

Учреждение здравоохранения «Национальная антидопинговая лаборатория», аг. Лесной, Республика Беларусь

✉ rlab@antidoping.by

Аннотация. Разработана методика для получения моно- и гетероклеточных сфероидов на основе гепатоцитов и фибробластов человека в ротационной системе культивирования с целью изучения метаболической активности и получения метаболитов I и II фаз биотрансформации андрогенных анаболических стероидов.

Ключевые слова: биореактор; 3D-система; сфероиды; культивирование; метаболизм; андрогенные анаболические стероиды; хромато-масс-спектрометрия.

Babaryko D., Danilenka A., Shynhel A., Syakhovich V., Bakakina Yu., Pakhadnia Yu.

Production 3D model systems based on human hepatocytes *in vitro* using a rotational bioreactor to study the metabolism of androgenic anabolic steroids

Health care institution «National Anti-Doping Laboratory», ag. Lesnoy, Republic of Belarus

Abstract. Method for obtaining mono- and heterocellular spheroids based on human hepatocytes and fibroblasts in a rotational culture system in order to study metabolic activity and obtain metabolites of phases I and II of androgenic anabolic steroids biotransformation have been developed.

Keywords: bioreactor; 3D system; spheroids; cultivation; metabolism; androgenic anabolic steroids; chromatography-mass spectrometry.

В настоящее время в биомедицине широко применяются различные технологии получения модельных клеточных систем *in vitro* для исследований цитотоксичности и метаболизма химических веществ либо лекарственных препаратов, оценки активности ферментных систем, фенотипических и пролиферативных свойств вирусов, а также для многих других направлений исследований. На данный момент трехмерные (3D) модели *in vitro* получают все большее распространение в связи с их способностью повторять микроструктуру печени, клетки остаются фенотипически стабильными и сохраняют специфические для гепатоцитов функции на более длительное время (поддержание метаболической активности, транспорт крупных макромолекул и обеспечение межклеточных взаимодействий) [1]. В частности, использование моно- и гетеро-клеточных 3D-культур является одним из перспективных методов для исследования метаболизма запрещенных в спорте субстанций [2].

Целью настоящего исследования являлась разработка 3D-моделей на основе клеточных линий гепатоцитов и фибробластов человека и сравнение их метаболической активности в отношении андрогенных анаболических стероидов (ААС) метандиенона, флюоксиместерона, оксандролон, станозолола.

Для подготовки 3D-моделей была использована клеточная линия гепатобластомы человека HepG2, а также фибробласты кожи человека. Для получения гетероклеточных сфероидов проводили сокультивирование гепатоцитов и фибробластов. С целью подбора условий для формирования сфероидов был рассмотрен ряд культуральных сред, факторов роста, а также роль кондиционирования культуральной среды в стимуляции образования 3D-структур.

Клетки культивировали в чашках Петри в ростовой среде α -MEM с 10 %-ной бычьей сывороткой и 1 %-ной смесью антибиотиков в CO₂-инкубаторе (Memmert, Германия) при 37 °C и содержании CO₂ 5 %. Для получения моноклеточных и гетероклеточных сфероидов использовали ротационный биореактор для 3D-культивирования RCCS-1 (Synthecon, США). Для стимуляции образования 3D-структур дополнительно вносили кондиционированную культуральную среду (в соотношении 1:1 (v/v) к исходной среде). Для визуализации гетероклеточности сфероидов использовали флуоресцентный краситель CFSE (Thermo Fisher, США).

Метаболическую активность клеточных систем тестировали с использованием ААС: метандиенона, флюоксиместерона, оксандролон, станозолола. С целью реализации возможности параллельного изучения метаболизма нескольких соединений, часть сформированных сфероидов из ротационной системы переносили в многоруночные планшеты с горизонтальным перемешиванием.

Анализ образцов культуральной среды проводили методом хромато-масс-спектрометрии высокого разрешения на жидкостном хроматографе Dionex Ultimate 3000 с масс-спектрометрическим детектором Q Exactive Plus (Thermo Scientific, США).

Инкубация ААС в моделях моно- и гетероклеточных сфероидов в ротационной системе, а также в планшетах позволила получить широкий спектр метаболитов I и II фаз оксандролон и флюоксиместерона. Сравнительный анализ метаболической активности сфероидов в отношении метандиенона в ротационной системе и планшетах показал более широкий спектр детектируемых метаболитов II фазы в случае биореактора (6 сульфоконъюгатов метаболитов метандиенона в ротационной системе и 1 сульфоконъюгат в планшетах). Модель сфероидов HepG2/фибробласты проявила более высокую метаболическую активность (снижение содержания исходного соединения) в отношении всех тестируемых соединений. В то же время модель моносфероидов на основе гепатоцитов позволила получить более широкий спектр метаболитов метандиенона и станозолола по сравнению с моделью гетероклеточных сфероидов. Более того, уровень метаболизма метандиенона и станозолола в системе ротационного культивирования составил около 35%, а в планшетах — менее одного процента. Одновременно метаболическая активность сфероидов в многоруночных планшетах с горизонтальным перемешиванием по отношению к другим ААС оказалась более значительной: падение содержания исходного соединения составило 24% для станозолола и метандиенона, 77% — для оксандролон.

В настоящей работе разработана методика для получения моно- и гетероклеточных сфероидов на основе гепатоцитов и фибробластов человека в ротационной системе культивирования для изучения метаболической активности андрогенных анаболических стероидов. Результаты исследований показали, что использование 3D-систем в перспективе можно применять для получения широкого спектра метаболитов различных соединений.

Список литературы

1. Godoy P., Hewitt N., Albercht U. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME // Arch Toxicol Access. 2024. Vol. 87. P. 1315–1530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5
2. Zhang Y., Liu L., Li N., Wang Yi., Yue X. 3D scaffold fabricated with composite material for cell culture and its derived platform for safety evaluation of drugs // Toxicol Access. 2024. Vol. 8. doi: 10.3390/ijms20194926

Базанович С.А.¹, Звягинцева М.А.¹, Морозова Я.В.¹, Радаев С.М.², Смирнов В.А.², Гринь А.А.², Рябов С.И.¹

Эффективность клеточной терапии криоконсервированными клетками пуповинной крови человека спинальной травмы: от эксперимента к клинике

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского, Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

✉ bazarus13.ukr@yandex.ru

Аннотация. В эксперименте и клинике травмы спинного мозга показано, что терапия криоконсервированными ядродержащими клетками пуповинной крови человека уменьшает объем посттравматической полости, улучшает восстановление движений конечностей, восстанавливает мочеиспускание и самостоятельное передвижение.

Ключевые слова: травма спинного мозга; клеточная терапия; моноклеарные клетки пуповинной крови человека.

Bazanovich S.A.¹, Zvyagintseva M.A.¹, Morozova Y.V.¹, Radaev S.M.², Smirnov V.A.², Grin' A.A.², Ryabov S.I.¹

The effectiveness of cell therapy with cryopreserved cord blood cells of human spinal injury: from experiment to clinic

¹ National medical research center of cardiology of Healthcare Ministry of the Russian Federation, Moscow, Russia

² N.V. Sklifosovskiy Research Institute of Emergency Medicine, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Abstract. In an experiment and a spinal cord injury clinic, it was shown that therapy with cryopreserved nucleated cells of human umbilical cord blood reduces the volume of the post-traumatic cavity, improves the restoration of limb movements, restores urination and independent movement.

Keywords: spinal cord injury; cell therapy; human umbilical cord blood mononuclear cells.

Ежегодно в России 8000 человек получают травму спинного мозга (ТСМ) и количество пострадавших постоянно увеличивается. Инвалидизация пострадавших при тяжелой ТСМ практически достигает 100%. 2,5 млн после ТСМ требуют нейрореабилитации и постоянного ухода. В связи с отсутствием естественной регенерации нервной ткани спинного мозга эффективная нейрореабилитация пострадавших прежде всего зависит от количества сохранившейся нервной ткани спинного мозга после ТСМ. Клеточная терапия может быть одной из терапевтических стратегий в лечении ТСМ, а использование криоконсервированных ядродержащих клеток пуповинной крови позволит эффективно применять ее в остром периоде травмы [1].

В эксперименте на животных тяжелая контузионная ТСМ на уровне Т9 была смоделирована у крыс методом «weight drop». Клеточную терапию проводили криоконсервированными моноклеарными клетками пуповинной крови человека, хранившимися в криобанке. Клетки после их размораживания вводились внутривенно на 1-е или 5-е сутки после ТСМ в количестве 10 млн клеток на животное [2].

Визуализация спинальной травмы проводилась методом магнитно-резонансной томографии (MRI). Оценка объема посттравматической кистозной полости спинного мозга проводилась на МРТ-сканере с разрешением 7,0 Тесла. После клеточной терапии объем полости уменьшался в 2 раза (с 3,5–0,3 мм³ до 1,74–0,5 мм³) [3].

Двигательную функцию задних конечностей оценивали с помощью балльной системы BBB в открытом поле, теста «РотаРод», теста на ходьбу по суживающейся балке [4, 5]. Тесты проводили еженедельно в течение 8 недель после травмы. Терапевтический эффект клеточной терапии составил 35–40% относительно уровня «самовосстановления» животного (без терапии). При этом результаты восстановления двигательной активности при внутривенном и внутриспинальном введении оказались одинаково эффективными. Результаты, полученные на животной модели, позволили перейти к ограниченным клиническим исследованиям на пациентах, получивших контузионную травму в результате несчастного случая.

Ограниченное рандомизированное неослепленное клиническое исследование применения криоконсервированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека было проведено у пациентов с ушибами спинного мозга тяжелой степени тяжести и неврологическим дефицитом (ASIA A и B, 20 пациентов). Пациентам с ТСМ в/в вводили размороженные клетки четыре раза в течение 1 месяца (с интервалом в 1 неделю). Первое — не позднее 3 суток после получения травмы (после выполнения первичного декомпрессивно-стабилизирующего вмешательства). Каждое введение — $300,8 \pm 39,7 \times 10^6$ мононуклеарных клеток. Через один год наблюдения средний показатель прироста по шкале ASIA через 1 год составил 2,2 балла в группе клеточной терапии и 0,9 в контрольной группе. Суммарный показатель двигательной активности верхних (UEMS) и нижних конечностей (LEMS) через 1 год составил 77 ± 19 баллов в группе клеточной терапии и $33 \pm 21,6$ в контрольной группе. Самостоятельно передвигаться могли 78% и 30% пациентов соответственно в каждой группе. Клеточная терапия способствовала снижению уровня спастичности и восстановлению самостоятельного мочеиспускания у пациентов с исходным нарушением функции тазовых органов.

Список литературы

1. Терапевтический потенциал клеток пуповинной крови при негематологических заболеваниях / под ред. М.А. Пальцева, В.Н. Смирнова. Москва: «Шико», 2012. 176 с.
2. Рябов С.И., и др. Эффективность трансплантации клеток плацентарной/пуповинной крови человека крысам с тяжелым повреждением спинного мозга // Вестник экспериментальной биологии и медицины. 2014. Т. 157. С. 85–88.
3. Ядгаров М.Я., Смирнов В.А., Базанович С.А., и др. Метод количественной оценки объема и структуры посттравматических образований в спинном мозге животных моделей с применением магнитно-резонансной томографии // Нейрохирургия. 2022. Т. 24, № 1. С. 38–44. EDN: BDYQQB doi: 10.17650/1683-3295-2021-24-1-38-44
4. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. Graded histological and locomotor outcomes after spinal cord contusion using the NYU weight-drop device versus transection // Exp Neurol. 1996. Vol. 139, N 2. P. 244–256. doi: 10.1006/exnr.1996.0098
5. Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats // J Neurotrauma. 1995. Vol. 12, N 1. P. 1–21. doi: 10.1089/neu.1995.12.1

Базылева К.Ю.✉, Шарикова Н.А., Малахов С.Н., Григорьев Т.Е.

Влияние условий кристаллизации полимерных растворов на структуру и свойства аэрогелей

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ bazyleva.ki18@physics.msu.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению кинетики заморозки полимерных растворов с наполнителем для создания аэрогелей на их основе с заданной структурой. Понимание того, как формируются кристаллы льда в таких системах, как полимерный раствор с микрочастицами, открывает новые возможности для управления морфологией материалов для конкретных применений.

Ключевые слова: аэрогели; лиофилизация; процесс заморозки; хитозан; тканевая инженерия.

Bazyleva K.Y., Sharikova N.A., Malahov S.N., Grigoriev T.E.

The influence of crystallization conditions of polymer solutions on the structure and properties of aerogels

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. The work is devoted to studying the kinetics of freezing polymer solutions with a filler to create aerogels based on them with a given structure. Understanding how ice crystals are formed in systems such as a polymer solution with microparticles opens up new possibilities for controlling the morphology of materials for specific applications.

Keywords: aerogels; lyophilization; freezing process; chitosan; tissue engineering.

Высокопористые трехмерные полимерные каркасы находят широкое применение в различных областях биомедицины. Такие материалы обладают рядом отличительных преимуществ для использования в тканевой инженерии, одним из которых является организация пор внутри матрикса. Пористость в трехмерном каркасе является важным фактором для тканевой инженерии [1]. 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 [2]. 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 [3].

Хитозан демонстрирует широкий спектр применений в качестве биоматериала из-за его хорошего поведения в организме человека, так как этот биополимер проявляет антимикробную активность, биоактивность, хемотактическое действие, иммуностимуляцию, ферментативную биоразлагаемость, слизистую адгезию или эпителиальную проницаемость, благоприятствуя его адгезии с различными типами клеток. Благодаря этому, данный полимер может быть использован при лечении ран, ожогов и язв из-за его гемостатических характеристик и ускоряющего эффекта заживления ран. С другой стороны, хитозан находит применение также в тканевой инженерии и регенеративной медицине из-за его биоразлагаемости и клеточного сродства. Материалы на его основе можно использовать для замещения хрящевых мембран, нервов, костной и трахеальной тканей [4]. Для каждого из применений требуется тонкая настройка условий приготовления для получения нужной архитектуры каркаса.

Одним из распространенных методов получения высокопористых материалов является лиофилизация. Этот метод позволяет получать материалы с высокой удельной поверхностью и различной архитектурой пор. Процесс лиофилизации состоит из двух этапов: замораживание полимерного раствора и последующая сублимационная сушка. Меняя скорость охлаждения на первом этапе, можно управлять зародышеобразованием и кинетикой роста кристаллов льда, что отражается на конечной структуре пор в материале [5]. Хотя существует качественное понимание физических основ метода, многие детали происходящих в нем процессов изучены не полностью.

Целью данной работы является исследование процесса заморозки полимерных растворов на основе хитозана для получения высокопористых материалов для конкретного применения.

Для исследования процесса заморозки в полимерных растворах нами была спроектирована и собрана замораживающая ячейка на основе элемента Пельтье ТВ-127-1.0-1.3. Для отвода тепла с горячей стороны мы использовали кулер (DEEPCOOL AG500 ARGB). В процессе замораживания образцов зависимость температуры от времени фиксировали с помощью сенсора Termodat-1,3М.

Для приготовления материалов использовался 2% раствор хитозана (43040 ChitoClear) в 2% растворе уксусной кислоты (ООО «Компонент-Реактив»). В исследовании также использовались растворы с добавлением технического углерода (ТУ, Vulcan XC 72R) как модельный объект в следующих весовых концентрациях (от массы полимера): 1, 5, 7,5, 10, 15, 20, 40, 60 масс.%. Далее приготовленные растворы замораживали на собранной нами ячейке в диапазоне мощностей от 43 Вт до 12 Вт. Затем образцы лиофилизировали в сушке Martin Christ Alpha 2-4LSC в течение 72 ч при глубине вакуума 0,250 мбар для исследования полученной морфологии 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.

Реологическое поведение объектов данной работы исследовали методом ротационной вискозиметрии на реометре MCR 501 (Anton Paar, Германия) в ячейках в геометрии параллельных плоскостей (PP-50). Зазор составлял 1 мм, диаметр плоскостей 50 мм. Измерения проводили в режиме контроля скорости сдвига (CSR), для нахождения кривых течения и вязкости. Все данные получены в автоматическом режиме при температуре 25°C. Обработку результатов проводили с помощью пакета компьютерных программ прибора Rheoplus 3.40 (Anton Paar, Германия).

В результате работы был получен ряд высокопористых материалов на основе хитозана с регулируемыми свойствами. На основе полученных результатов выявлено влияние скорости заморозки на морфологию губчатых материалов. Был проведен сравнительный анализ образцов с различной морфологией и характеристиками. Для более детального исследования кинетики заморозки полимерных растворов была спроектирована и собрана замораживающая установка на основе элемента Пельтье. Было проанализировано, как локальные тепловые параметры влияют на структуру анизотропных каркасов. Анализ влияния наполнителя в виде технического углерода на теплофизические свойства и морфологию был проведен рядом методов: реологические исследования и сканирующая электронная микроскопия. Используя полученные в результате работы данные, можно предсказать морфологию высокопористых материалов для медицинских применений. Такие каркасы можно не только использовать для замещения поврежденных тканей в организме человека, но и как модельные системы в исследовательских целях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение 075-15-2023-324) с использованием оборудования ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Stratton S., Shelke N.B., Hoshino K., et al. Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering // *Bioactive Materials*. 2016. Vol. 1, N 2. P. 93–108. doi: 10.1016/j.bioactmat.2016.11.001

2. Zeltinger J., Sherwood J.K., Graham D.A., et al. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition // *Tissue Eng.* 2001. Vol. 7, N 5. P. 557–572. doi: 10.1089/107632701753213183
3. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations // *Eur Spine J.* 2008. Vol. 17, N S4. P. 467–479. doi: 10.1007/s00586-008-0745-3
4. Jiménez-Gómez C.P., Cecilia J.A. Chitosan: a natural biopolymer with a wide and varied range of applications // *Molecules.* 2020. Vol. 25, N 17. ID 3981. doi: 10.3390/molecules25173981
5. Pawelec K.M., Husmann A., Best S.M., Cameron R.E. Understanding anisotropy and architecture in ice-templated biopolymer scaffolds // *Mat Sci Eng: C.* 2014. Vol. 37. P. 141–147. doi: 10.1016/j.msec.2014.01.009

Базылева К.Ю.✉, Малахов С.Н., Шариков Р.В., Григорьев Т.Е.

Исследование влияния скорости заморозки на структуру и свойства губчатых материалов на основе поливинилового спирта

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ bazyleva.ki18@physics.msu.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению влияния скорости заморозки полимерных растворов на морфологические и механические свойства получаемых высокопористых губчатых материалов. В качестве объекта исследования использовался поливиниловый спирт (ПВС).

Ключевые слова: лиофилизация; скорость заморозки; тканевая инженерия.

Bazyleva K.Y., Malahov S.N., Sharikov R.V., Grigoriev T.E.

Study of the effect of freezing rate on the morphology and properties of polyvinyl alcohol-based sponge materials

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. The work is devoted to studying the effect of freezing rate of polymer solutions on the morphological and mechanical properties of the resulting highly porous spongy materials. Polyvinyl alcohol (PVA) was used as the object of study.

Keywords: lyophilization; freezing rate; tissue engineering.

Одной из ключевых задач тканевой инженерии является разработка клеточных каркасов — трехмерных структур с большой удельной площадью поверхности, на которой будет происходить формирование новых тканей. Такие каркасы имитируют морфологию и свойства естественного внеклеточного матрикса [1]. Одним из распространенных методов получения высокопористых материалов является сублимационная сушка (лиофилизация). Первая стадия — процесс заморозки. В зависимости от скорости и способа заморозки можно изменять пористость, размер пор и удельную площадь поверхности образцов, что влияет на свойства полученных материалов и определяет область применения [2]. Данная работа посвящена исследованию губчатых материалов на основе поливинилового спирта (ПВС), полученных методом сублимационной сушки. Такие материалы перспективны для использования в медицине, например для доставки лекарств и в качестве клеточных каркасов.

Для получения материалов использовали 6%-ный водный раствор ПВС (Sigma-Aldrich, США, $M_w = 130$ кДа) с добавлением сшивающего агента — глутарового альдегида (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 0,005 и 0,01 к 1 осново-моль полимера в присутствии HCl (Компонент-Реактив, Россия, о.с.ч.). Полученные растворы замораживали при температурах -25 °C и -70 °C, в жидком азоте и в условиях температурного градиента. Процесс контролировался с помощью спектрометра Ocean Optics и сенсора Termodat-1,3М. После все замороженные материалы лиофилизировали на установке Martin Christ Alpha 2-4LSC installation в течение 72 ч при глубине вакуума 0,250 мбар. Исследование морфологии образцов проводили при помощи растрового электронного микроскопа Phenom XL (Thermo Fisher Scientific, США). Структуру образцов в набухшем состоянии исследовали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) в режиме окружающей среды (ЕСЭМ) на приборе Versa 3D DualBeam (Thermo Fisher Scientific, США). Изображения в режиме ЕСЭМ были получены с использованием низковакуумного детектора

вторичных электронов GSED при ускоряющем напряжении 10 кВ и токе 93 пА. Удельную поверхность исследовали на анализаторе 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). Для изучения механических свойств образцы испытывали при одноосном сжатии на универсальной разрывной машине Instron 5965.

В результате работы получен ряд губчатых материалов на основе ПВС с различной архитектурой. Установлено влияние скорости заморозки на морфологию и свойства губок на основе ПВС, что позволяет синтезировать высокопористые материалы с контролируемой структурой для биомедицины.

Авторы благодарят ресурсный центр (РЦ) «Оптика» и РЦ аддитивных и виртуальных технологий ОРЦ КК НИБКС–ПТ за исследование морфологии образцов и помощь в изготовлении экспериментальной установки. Работа выполнена при поддержке государственного задания НИЦ «Курчатовский институт»

Список литературы

1. Teodorescu M., Bercea M., Morariu S. Biomaterials of PVA and PVP in medical and pharmaceutical applications: Perspectives and challenges // *Biotechnol Adv.* 2019. Vol. 37, N 1. P. 109–131. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.008
2. Konstantinidis A.K., Kuu W., Otten L., et al. Controlled nucleation in freeze-drying: Effects on pore size in the dried product layer, mass transfer resistance, and primary drying rate // *J Pharm Sci.* 2011. Vol. 100, N 8. P. 3453–3470. doi: 10.1002/jps.22561

Баклашев В.П.^{1–4}

Нейрорегенеративная терапия спинальной травмы: протезировать нельзя восстановить?

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия³ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия⁴ ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи ФМБА России, Москва, Россия

✉ baklaushev@fccps.ru

Аннотация. В докладе освещается современное состояние регенеративной терапии спинальной травмы, в т.ч. приводятся собственные результаты по репрограммированию *in situ*, комбинированной терапии с помощью трансплантации стволовых клеток с последующей эпидуральной стимуляцией спинного мозга.

Ключевые слова: позвоночно-спинномозговая травма; регенеративная терапия; пронеурональное репрограммирование; нейромодуляция; нейропротезирование.

Baklaushev V.P.^{1–4}

Neuroregenerative therapy for spinal cord injuries: recovery or prosthesis?

¹ Federal Center for Brain and Neurotechnologies, FMBA of Russia, Moscow, Russia² V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia⁴ Federal Clinical and Research Center for Specialized Medical Care, FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. The report presents the current state of regenerative therapy for spinal cord injury, including our own results on combined therapy using *in situ* reprogramming, stem cell transplantation followed by epidural stimulation of the spinal cord.

Keywords: spinal cord injury; regenerative therapy; proneuronal reprogramming; neuromodulation; neuroprosthetics.

Современные стратегии реабилитации пациентов с тяжелыми поражениями ЦНС подразумевают адаптацию пациента к измененным условиям существования и максимально возможное сохранение качества жизни с помощью протезирования функции и изменения среды вокруг пациента с необратимо утраченными функциями. Современная регенеративная медицина пока не в состоянии предложить другую парадигму реабилитации неврологических пациентов. Возможно ли кардинальное изменение ситуации в будущем или решение данной проблемы будет осуществлено с помощью усовершенствования нейропротезирования (нейроинтерфейс-управляемые экзоскелеты, бионические протезы, дополненная реальность и пр.)?

Ограниченные возможности регенерации ЦНС у человека требуют создания новых источников нейрональных стволовых клеток (НСК) для регенерации. Таким источником могут быть репрограммированные в нейральном направлении аутологичные соматические клетки. В течение последней декады активно разрабатываются технологии прямого пронеуронального репрограммирования или трансдифференцировки, минуя стадию клеток с индуцированной плюрипотентностью. Предпринимаются весьма интересные попытки прямого репрограммирования *in situ*, т.е. непосредственно в очаге патологии. Краеугольной проблемой успешной регенеративной терапии церебральной и спинальной травмы является предотвращение развития грубого соединительнотканного рубца на месте травмы, препятствующего регенерации проводящих путей спинного мозга. С целью его преодоления разрабатываются различные скаффолды, облегчающие

прорастание аксонов, а также испытываются различные генотерапевтические средства на основе аденоассоциированных вирусов (AAV), несущих последовательности регуляторных белков или siRNA для нокдауна ключевых факторов образования рубца или, наоборот, активации ремоделирования внеклеточного матрикса и репаративной регенерации. Крайне интересными и перспективным при заболеваниях и травмах ЦНС представляются комбинированные подходы, включающие репрограммирование, предотвращение образования рубца и эпидуральную электрическую стимуляцию спинного мозга, активирующую так называемые SPG нейроны и способствующую восстановлению локомоторной функции. В настоящем докладе будут освещены результаты наших собственных исследований по прямому репрограммированию с помощью AAV-NeuroD1 и комбинированной терапии спинальной травмы с помощью трансплантации стволовых клеток и нейро-модуляции на модели крупных лабораторных животных.

Бакуменко С.С.^{1,2} ✉, Джабраилов В.Д.¹, Сергеева Т.О.^{1,2}, Слотвицкий М.М.^{1–3}, Цвелая В.А.^{1–3},
Агладзе К.И.^{1,3}, Богомолов П.О.⁴

Исследование функциональности гепатоцитов на примере концентрации альбумина с использованием спектрофотометрического анализа

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

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

⁴ Московский областной гепатологический центр, Москва, Россия

✉ bakumenko.ss@phystech.edu

Аннотация. В ходе работы был подобран и модифицирован протокол выделения гепатоцитов по принципу ферментативной перфузии. Также был проведен подбор оптимальной подложки с соответствующими адгезивными свойствами. Функциональность гепатоцитов в период длительного культивирования была подтверждена результатами спектрофотометрического анализа на альбумин.

Ключевые слова: гепатоциты; клеточная терапия; тканевая инженерия; нановолоконные матрицы; регенеративная медицина; искусственная печень.

Bakumenko S.S.^{1,2}, Dzhabrailov V.D.¹, Sergeeva T.O.^{1,2}, Slotvitsky M.M.^{1–3}, Tselaya V.A.^{1–3},
Agladze K.I.^{1,3}, Bogomolov P.O.⁴

Study of hepatocyte functionality based on albumin concentration using spectrophotometric analysis

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² ITMO University, Saint Petersburg, Russia

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

⁴ Moscow Regional Hepatology Center, Moscow, Russia

Abstract. In the course of this work, a protocol for hepatocyte isolation using the principle of enzymatic perfusion was selected and modified. The selection of an optimal substrate with appropriate adhesive properties was also carried out. The functionality of hepatocytes during long-term cultivation was confirmed by spectrophotometric analysis for albumin.

Keywords: hepatocytes; cell therapy; tissue engineering; nanofiber matrices; regenerative medicine; artificial liver.

Одной из наиболее актуальных задач современной медицины является развитие персонализированных методов лечения болезней печени. Актуальность данной проблемы объясняется острым недостатком донорских органов и сниженной продолжительностью жизни реципиентов после трансплантации печени. На сегодняшний день среди альтернативных путей компенсаторной терапии печени стоит выделить следующие биоинженерные подходы: пересадка части органа и клеточных структур, использование аппаратов искусственного диализа и 3D-биопринтинг [1]. В рамках представленной работы мы разрабатываем принципиально новый метод компенсаторной терапии: портативное устройство со сменными пациент-специфичными биокартриджами. Преимущество использования данного устройства состоит в том, что сменный картридж с гепатоцитами не удерживает белковые молекулы, ответственные за тромбогенез, в отличие от полупроницаемой мембраны диализатора, а также в отсутствии иммунного отторжения, возникающего при пересадке органа, его части [2].

На первой стадии разработки был подобран и модифицирован протокол выделения гепатоцитов, основанный на принципе ферментативной перфузии печени, что позволило получить высокоочищенную клеточную культуру [3]. Среднее количество гепатоцитов, выделенных из крысиной печени, составляет ~10 млн клеток из 1 печени крысы. Далее осуществлялся подбор оптимальной подложки с соответствующими адгезивными свойствами. В результате тестирования 8 материалов было установлено, что наиболее подходящей подложкой служит полидиметилсилоксан (ПДМС), покрытый желатином и поликапролактоновыми волокнами. В процессе длительного культивирования шестнадцати первичных культур гепатоцитов, выделенных из лабораторных крыс, было установлено, что клетки нормально функционируют вплоть до 25-го дня и образуют кластерную структуру на волокнах. Наглядным индикатором нормального функционирования гепатоцитов при их длительном культивировании является экспрессия альбумина. Проводился спектрофотометрический анализ растворов, которые накапливали альбумин в течение различного времени, вплоть до 7-го дня.

Подобрана оптимальная подложка для культивирования гепатоцитов и проведен спектрофотометрический анализ для оценки функциональности клеток.

Список литературы

1. Lee S.Y., Kim H.J., Choi D. Cell sources, liver support systems and liver tissue engineering: alternatives to liver transplantation // *Int J Stem Cells*. 2015. Vol. 8, N 1. P. 36–47. doi: 10.15283/ijsc.2015.8.1.36
2. Du X., Chang S., Guo W., et al. Progress in liver transplant tolerance and tolerance-inducing cellular therapies // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11. ID 1326. doi: 10.3389/fimmu.2020.01326
3. Shen L., Hillebrand A., Wang D.Q.-H., Liu M. Isolation and primary culture of rat hepatic cells // *JoVE*. 2012. Vol. 64. ID e3917. doi: 10.3791/3917

Баранова Н.В.¹ ✉, Величко В.В.^{1,2}, Пономарева А.С.¹, Кирсанова Л.А.¹, Басок Ю.Б.¹, Севастьянов В.И.^{1–3}

Разработка и исследование биомиметика внеклеточного матрикса на основе децеллюляризованной селезенки крысы

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет "Высшая школа экономики"», Москва, Россия

³ АНО «Институт биомедицинских исследований и технологий», Москва, Россия

✉ barnats@yandex.ru

Аннотация. Выбран оптимальный протокол децеллюляризации ткани селезенки крысы, позволяющий получить скаффолд в наибольшей степени очищенный от клеточных фрагментов и ДНК с сохраненной структурой внеклеточного матрикса селезенки, который может быть использован в тканевой инженерии.

Ключевые слова: селезенка; децеллюляризация; внеклеточный матрикс; скаффолд; тканевая инженерия.

Baranova N.V.¹, Velichko V.V.^{1,2}, Ponomareva A.S.¹, Kirsanova L.A.¹, Basok Yu.B.¹, Sevastianov V.I.^{1–3}

Obtaining and research of extracellular matrix biomimetic based on decellularized rat spleen

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia

² National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russia

Abstract. The optimal protocol of rat spleen tissue decellularization has been selected, which makes it possible to obtain a scaffold that is most purified from cell fragments and DNA with a preserved structure of the spleen extracellular matrix, which can be used in tissue engineering.

Keywords: spleen; decellularization; extracellular matrix; scaffold; tissue engineering.

Существующие способы децеллюляризации тканей направлены на максимальное сохранение структуры и состава внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ тканей и органов находится в тесной взаимосвязи с клетками, влияя на их миграцию, пролиферацию и дифференцировку. Благодаря своим уникальным биологическим свойствам одними из наиболее перспективных для разработки биомедицинских клеточных продуктов для лечения различных тяжелых заболеваний считают биомиметики ВКМ из децеллюляризованных тканей [1, 2]. Потенциальное использование таких биомиметиков ограничено дефицитом донорских органов, поэтому существует необходимость поиска альтернативного доступного ксеногенного источника для их получения. В связи с этим децеллюляризация селезенки представляется перспективным подходом к получению скаффолда, который при рецеллюляризации соответствующими типами клеток может быть использован в составе биомедицинских клеточных продуктов с определенными функциональными свойствами [3]. Особый интерес представляет использование децеллюляризованной селезенки в тканевой инженерии печени, так как оба органа являются паренхиматозными, а микроокружение селезенки позволяет поддерживать пролиферацию аллогенных трансплантированных гепатоцитов *in vivo* [4].

Целью данной работы является выбор протокола децеллюляризации фрагментов ткани селезенки крысы для получения и исследования скаффолда.

Опробованы 8 протоколов децеллюляризации фрагментов ткани селезенки крысы, размером 1×1×2 мм. В каждом использовали оптимальную комбинацию физических и химических техник децеллюляризации селезенки: замораживание (–20°C) / оттаивание (+37°C), последовательная обработка ткани гипотоническим

(0,1% додецилсульфат натрия (SDS) + H₂O) и гипертоническим (1N раствор NaCl + 0,1% SDS) растворами, обработка ткани 0,1% раствором SDS в фосфатно-солевом буфере (PBS), обработка лизирующим раствором (1-, 5- и 10-кратного разведения) от 1 до 3 часов, обработка PBS с добавлением 0,1 и 1% Triton X-100. Децеллюляризацию фрагментов селезенки проводили в условиях постоянного перемешивания в ротационной системе MultiBio RS-24 (BioSan, Латвия) со скоростью 15 об/мин. Для оценки эффективности процесса децеллюляризации проводили гистологическую оценку полученных образцов скаффолдов с помощью окрашивания гематоксилином и эозином и на общий коллаген по методу Массона. Исследовали цитотоксичность полученных скаффолдов методом прямого контакта на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3. Оценивали адгезию и пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани крысы (МСК ЖТ крысы), рецеллюляризованных на скаффолд из децеллюляризованной селезенки крысы. Проводили окрашивание NIH/3T3 и МСК ЖТ крысы флуоресцентным витальным красителем LIVE/DEAD Cell Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular probes by Life Technologies, США).

В результате децеллюляризации фрагментов селезенки крысы по протоколам с использованием лизирующего раствора (1- и 5-кратного разведения) получали скаффолды с содержанием большого количества эритроцитов и нарушенной структурой. Применение протокола, включающего стадию инкубации ткани в лизирующем растворе (10-кратного разведения) в течение 1 часа, дало возможность получить пористый скаффолд, но недостаточно очищенный от клеточной массы. Инкубация ткани в лизирующем растворе (10-кратного разведения) в течение 2 часов приводила к уменьшению содержания эритроцитов, но нарушалась пористость скаффолда. Сохранение единичных клеток в ткани наблюдалось при инкубации в лизирующем растворе (10-кратного разведения) в течение 3 часов, однако структура скаффолда была полностью разрушена. Обработка ткани PBS с добавлением 0,1% Triton X-100 приводила к сохранению в скаффолде значительного числа эритроцитов. Применение 1% Triton X-100 недостаточно снижало количество эритроцитов в пористом волокнистом скаффолде. Результаты гистологического исследования показали практически полное отсутствие клеточных компонентов в пористом скаффолде с большим количеством коллагеновых волокон (ДС скаффолде) при использовании следующего протокола: циклическое повторение замораживания и оттаивания, последовательная обработка фрагментов ткани гипотоническим и гипертоническим растворами и дальнейшая обработка в 0,1% растворе SDS в PBS. Проведенные исследования продемонстрировали отсутствие цитотоксического действия полученного ДС скаффолда. ДС скаффолд поддерживал адгезию и пролиферацию МСК ЖТ крысы, рецеллюляризованных на его поверхность. Флуоресцентное окрашивание LIVE/DEAD на 7-е сутки культивирования МСК ЖТ крысы с ДС скаффолдом демонстрировало жизнеспособность клеток.

Таким образом, используя оптимальный протокол децеллюляризации, мы получили ДС скаффолд, в наибольшей степени очищенный от клеточных фрагментов и ДНК, с сохраненной структурой ВКМ селезенки, который может быть применен в тканевой инженерии.

Список литературы

1. Sevastianov V.I., Ponomareva A.S., Baranova N.V., et al. Decellularization of human pancreatic fragments with pronounced signs of structural changes // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 1. ID 119. doi: 10.3390/ijms24010119.28
2. Zhang F., Gao H., Jiang X., et al. Biomedical application of decellularized scaffolds // *ACS Appl Bio Mater*. 2023. Vol. 6, N 12. P. 5145–5168. doi: 10.1021/acsabm.3c00778
3. Zanardo T.É.C., Amorim F.G., Taufner G.H., et al. Decellularized splenic matrix as a scaffold for spleen bioengineering // *Front Bioeng Biotechnol*. 2020. Vol. 8. ID 573461. doi: 10.3389/fbioe.2020.573461
4. Gao R., Wu W., Xiang J., et al. Hepatocyte culture in autologous decellularized spleen matrix // *Organogenesis*. 2015. Vol. 11, N 1. P. 16–29. doi: 10.1080/15476278.2015.1011908

Барановский Д.С., Клабуков И.Д. ✉, Колобаев И.В., Усачев В.С., Афонин Г.В., Усачева А.Ю., Шкляев С.С., Иванов С.А., Шегай П.В., Каприн А.Д.

Клинический опыт двухэтапной персонализации в реконструктивной хирургии: первое в мире применение индивидуально изготовленного титанового эндопротеза в комбинации с локальными инъекциями минимально манипулированных клеток

Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. Обогащение титановых имплантов минимально манипулированными мононуклеарами периферической крови представляет собой перспективное направление в реконструктивной хирургии, способное потенциально значительно улучшить клинические исходы и качество жизни пациентов.

Ключевые слова: клеточная терапия; минимально манипулированные клетки; регенеративная медицина; реконструктивная хирургия; тканевая инженерия.

Baranovskii D.S., Klabukov I.D., Kolobaev I.V., Usachev V.S., Afonin G.V., Usacheva A.Y., Shklyayev S.S., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D.

Clinical case of two-step personalization in reconstructive surgery: the world's first application of a customized titanium endoprosthesis combined with local injections of minimally manipulated cells

National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

Abstract. Enrichment of titanium implants with minimally manipulated cells derived from peripheral blood is a promising approach to improve reconstructive surgical outcomes and patient quality of life.

Keywords: cell therapy; minimally manipulated cells; regenerative medicine; reconstructive surgery; tissue engineering.

Минимально манипулированные клетки являются новым типом объекта трансплантации, представляющим собой клетки после минимальной обработки и сохранившие свои естественные свойства, что способствует их лучшей жизнеспособности и сохранению функциональности в организме [1]. Обогащение имплантов минимально манипулированными клетками для улучшения клинических исходов реконструктивных операций представляет собой инновационный подход в современной медицине [2], поскольку такие клетки являются объектом трансплантации и их применение не требует выполнения регистрационных процедур.

В настоящем исследовании, одобренном протоколом Локального этического комитета №793 от 11.03.2022, проводилось предварительное выделение (аферез) мононуклеаров периферической крови на аппарате MSC+ (Haemonetics) в объеме 30 мл и концентрации 1 млн клеток/мл и дальнейшее их использование для инъекционного обогащения зоны имплантации титанового эндопротеза при реконструкции грудины пациенту с хондросаркомой. В настоящей работе обогащение зоны титанового импланта выделенными минимально манипулированными клетками проводилось непосредственно в операционной.

Наблюдение показало, что применение интраоперационного обогащения зоны импланта минимально манипулированными клетками привело к значительному улучшению состояния пациента. В частности,

наблюдалось ускоренное заживление тканей, улучшение интеграции импланта с окружающими тканями. Спустя один год после реконструкции пациент демонстрировал положительные результаты, включая улучшение общего состояния здоровья и полное отсутствие постимплантационных осложнений [3].

Таким образом, обогащение титановых имплантов минимально манипулированными моноклеарами периферической крови представляет собой перспективное направление в реконструктивной хирургии, способное потенциально значительно улучшить клинические исходы и качество жизни пациентов.

Список литературы

1. Krasilnikova O.A., Klabukov I.D., Baranovskii D.S., et al. The new legal framework for minimally manipulated cells expands the possibilities for cell therapy in Russia // *Cytotherapy*. 2021. Vol. 23, N 8. P. 754–755. doi: 10.1016/j.jcyt.2021.03.007
2. Baranovskii D.S., Akhmedov B.G., Demchenko A.G., et al. Minimally manipulated bone marrow-derived cells can be used for tissue engineering in situ and simultaneous formation of personalized tissue models // *Bull Exp Biol Med*. 2022. Vol. 173, N 1. P. 139–145. doi: 10.1007/s10517-022-05509-z
3. Kolobaev I.V., Usachev V.S., Klabukov I.D., et al. First experience of personalized tissue engineering in situ for thoracic surgery of the sarcoma patient: MSCs-containing minimally manipulated cells and individualized micropore titanium sternum in one-year follow-up case report // *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*. 2024.

Баркалова М.К. ✉, Воробьев А.Н., Ненахова-Гельфанд М.В., Абрамович Р.А., Потанина О.Г.

Антипролиферативная активность пеллет дигидрокверцетина

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

✉ barkalovamaria@yandex.ru

Аннотация. Дигидрокверцетин — биофлавоноид, обладающий различными фармакологическими эффектами. Он активен при терапии коронавирусной инфекции, доказано его антипролиферативное действие. Для увеличения биодоступности была разработана лекарственная форма пеллеты, увеличивающая его скорость всасывания.

Ключевые слова: дигидрокверцетин; биофлавоноид; антиоксидант; антипролиферативная активность; опухолевые клетки; пеллеты.

Barkalova M.K., Vorobyev A.N., Nenakhova-Gelfand M.V., Abramovich R.A., Potanina O.G.

Antiproliferative activity of dihydroquercetin pellets

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Dihydroquercetin is a bioflavonoid with diverse pharmacological effects. It is effective against coronavirus infection and has a proven antiproliferative activity. To increase bioavailability we have developed pellets, thus increasing absorption rate.

Keywords: dihydroquercetin; bioflavonoid; antioxidant; antiproliferative activity; tumor cells; pellets.

Увеличение продолжительности и качества жизни является приоритетным направлением сферы здравоохранения. Особенный интерес представляют малоинвазивные и малотоксичные средства, к которым относятся препараты на основе лекарственного растительного сырья. Накопленные научные данные доказывают эффективность и высокий профиль безопасности лекарственных средств растительного происхождения.

Дигидрокверцетин — флавоноид, представляющий собой восстановленный кверцетин, получаемый из древесины лиственницы Сибирской и лиственницы Даурской, оказывает целый спектр положительных фармакологических эффектов. Известна антиоксидантная активность дигидрокверцетина, превосходящая таковую у токоферола и каротина, капилляропротекторное, гепато- и гастропротекторное действие, противовоспалительная активность. Вещество нормализует гемодинамику, восстанавливает тонус сосудов [1]. В пожилом возрасте особую опасность представляют сердечно-сосудистые заболевания, а жесткость стенок сосудов является биомаркером старения организма [2]. В связи с этим препараты, поддерживающие и укрепляющие сосудистые стенки, играют важную роль в поддержании организма и улучшении качества жизни. Применение дигидрокверцетина в комплексной терапии при COVID-19 способствовало восстановлению функционирования органов, повреждающихся при коронавирусной инфекции, таких как сердце, легкие и др. [3].

Недостатком дигидрокверцетина является его низкая биодоступность, которая связана с плохой растворимостью, определяемой формой и размером кристаллов субстанции. Формирование лекарственной формы пеллеты позволит увеличить площадь соприкосновения лекарственного средства с жидкостью желудочно-кишечного тракта и, как следствие, увеличит скорость растворения и всасывания. Нами была разработана технология получения пеллет с дигидрокверцетином и арабиногалактаном в качестве вспомогательного вещества, сопутствующее вещество дигидрокверцетина.

В рамках изучения терапевтических свойств дигидрокверцетина нами была исследована антипролиферативная активность на клеточных линиях: CaCu-1, A549, MDA231, MCF7, HaCaT, где первые 4 — клетки опухолей различного генеза, а последняя линия — это нормальные клетки, взятые в качестве контроля.

Клетки рассеивались на 24-луночные планшеты по 40 тыс. опухолевых клеток и 50 тыс. здоровых клеток на лунку. Через сутки добавлялся препарат в различной концентрации: в первые контрольные лунки добавляли по 10 мкл растворителя, в остальные — по 10 мкл действующего вещества. Таким образом, в лунках были следующие концентрации дигидрохверцетина: 0, 0,01 мг/мл, 0,1 мг/мл, 1 мг/мл, 1,5 мг/мл и 2,0 мг/мл. Клетки инкубировались 72 часа, и затем был проведен МТТ-тест для определения интенсивности роста клеток. По результатам теста нами были получены значения IC_{50} для каждой клеточной линии. Для SaCu-1 — 1,33 мМ, A549 — 1,464 мМ, MDA231 — 1,344 мМ, MCF7 — 0,916 мМ, HaCaT — 1,79 мМ. Дигидрохверцетин показал большую активность на опухолевых клетках, по сравнению со здоровой линией, что свидетельствует о перспективности его применения в качестве адъюванта к терапии онкологических заболеваний. В зависимости от типа опухолевых клеток значения IC_{50} также различаются, что говорит о целесообразности дальнейших исследований механизмов действия препарата для определения мишеней его приложения.

Дигидрохверцетин демонстрирует свою эффективность при различных заболеваниях, а применение его в профилактических целях может способствовать предотвращению развития хронических и дегенеративных заболеваний и, как следствие, улучшить качество жизни. Лекарственная форма пеллеты облегчает дозирование и применение вещества.

Список литературы

1. Орлова С.В., Татаринев В.В., Никитина Е.А., и др. К вопросам биодоступности и безопасности дигидрохверцетина (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 2021. Т. 55, № 11. С. 3–8. EDN: EXVLFT doi: 10.30906/0023-1134-2021-55-11-3-8
2. Сорокина А.Г., Ефименко А.Ю., Григорьева О.А., и др. Взаимосвязь жесткости магистральных сосудов и биомаркеров накопления сенесцентных клеток у пожилых пациентов // Кардиология. 2022. Т. 62, № 6. С. 15–22. EDN: PXWHYI doi: 10.18087/cardio.2022.6.n2033
3. Татаринев В.В., Орлова С.В., Никитина Е.А., и др. Дигидрохверцетин как потенциальный иммунонутриент в комплексной терапии COVID-19 // Медицинский алфавит. 2021. № 21. С. 28–32. EDN: AEFBCF doi: 10.33667/2078-5631-2021-21-28-32

Басалова Н.А.¹✉, Виговский М.А.¹, Попов В.С.¹, Григорьева О.А.¹, Лагерева Е.А.², Ефименко А.Ю.¹

Роль активированных стромальных клеток в прогрессии и реверсии фиброза

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

² Научно-исследовательская лаборатория генных и клеточных технологий, Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ natalia_ba@mail.ru

Аннотация. Одним из ключевых типов клеток, участвующих в прогрессии фиброза и формировании фибротических фокусов являются активированные стромальные FAP α -позитивные фибробласты, во многом воспроизводящие роль фибробластов, ассоциированных с опухолью (ФАО).

Ключевые слова: активированные стромальные клетки; фиброз; миофибробласты; фибробласты; белок активации фибробластов; FAP α .

Basalova N.A.¹, Vigovsky M.A.¹, Popov V.S.¹, Grigorieva O.A.¹, Lagereva E.A.², Efimenko A.Yu.¹

The role of activated stromal cells in fibrosis progression and reversion

¹ Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Activated stromal FAP α -positive cells are one of the key cell types involved in the progression of fibrosis and the formation of fibrotic foci, largely repeating role of cancer-associated fibroblasts (CAF).

Keywords: activated stromal cells; fibrosis; myofibroblasts; fibroblasts; fibroblast activation protein; FAP α .

Развитие фиброза тканей представляет собою процесс, включающий взаимодействие множества типов клеток и сигнальных каскадов, что делает поиск эффективных антифибротических агентов сложной задачей. Длительное время миофибробласты считались ключевым типом клеток, опосредующим развитие фиброза, и, таким образом, являлись основной мишенью терапии. Однако подходы, основанные на подавлении функции миофибробластов или стимуляции их элиминации, не продемонстрировали достаточной эффективности в клинической практике. Поэтому сегодня поиск новых клеточных мишеней, воздействие на которые позволяло бы регулировать развитие фиброза, остаётся актуальной задачей.

Активированные стромальные клетки, способные к быстрой пролиферации и инвазивному распространению в область здоровой ткани, по-видимому, могут являться такой целевой популяцией — как за счет более доступной локализации в ткани, так и высокой восприимчивости к различным регуляторным сигналам. Клетки данной субпопуляции экспрессируют белок активации фибробластов альфа (FAP α). Несмотря на то, что изначально FAP α был предложен как маркер фибробластов при фиброзе, долгое время FAP α изучался преимущественно в контексте канцерогенеза как маркер фибробластов, ассоциированных с опухолью (ФАО, cancer-associated fibroblasts, CAF). FAP α ⁺ФАО являются неотъемлемым компонентом опухолевой стромы, играя ключевую роль в формировании опухолевой ниши и её метастазировании. Накапливающиеся данные о разнообразных функциях FAP α позволяют предполагать, что этот белок является не только маркером активированного состояния клеток при различных патологиях, но и выполняет в них важные функции, в том числе при прогрессировании фиброза. Поэтому целью этой работы было установление динамики появления и особенностей тканевой компартиментализации активированных стромальных клеток, в том числе FAP α ⁺, при прогрессии и реверсии фиброза.

Для исследования использовали модель блеомицин-индуцированного фиброза легких мышей C57bl/6. Динамику развития фиброза оценивали на 3, 7, 14, 28-е сутки, а также оценивали процесс реверсии фиброза — через 3, 4, 5 месяцев после введения блеомицина. Для оценки уровня фиброза и выбора оптимальных точек исследования использовали MPT, а также окрашивание срезов ткани гематоксилин-эозином и пикросириусом красным. Расположение, количество и колокализацию маркеров основных типов клеток, ассоциированных с развитием фиброза, включая маркер общей популяции стромальных клеток (CD90), активированных стромальных клеток (FAP α), миофибробластов (α SMA), макрофагов M2 типа (CD206, CD163), эпителия (цитокератин), основных белков внеклеточного матрикса (ВКМ) (коллаген I типа, фибронектин) и пролиферирующих клеток (PCNA), оценивали методом иммуногистохимии.

Мы показали, что FAP α ⁺ клетки практически отсутствуют в ткани легкого у интактных животных. Вместе с тем они появляются уже на ранних сроках (через 3 дня) после повреждения, что предшествует появлению других клеток — активных участников фибропролиферативного ответа, таких как миофибробласты или макрофаги. Поскольку FAP α ⁺ клетки располагаются рядом с эпителием, можно предположить, что они способны к быстрой активации за счет сигналов, полученных непосредственно от поврежденных эпителиальных клеток. Активированные клетки начинают дифференцироваться в α SMA⁺ миофибробласты к 7-му дню после повреждения. В дальнейшем этот процесс приводит к утолщению стенок альвеол как за счет высокой пролиферативной активности FAP α ⁺ клеток, так и за счет их дифференцировки и дифференцировки других типов клеток в миофибробласты. Этот процесс приводит к образованию и последующему слиянию FAP α ⁺ α SMA⁺ фибротических фокусов, богатых фибронектином и, вероятно, другими белками ВКМ. Вместе с тем стоит отметить, что в процессе формирования фибротического фокуса FAP α ⁺ клетки практически не экспрессируют другой маркер активированной стромы — CD90. В уже сформированном фибротическом фокусе α SMA⁺CD90⁻FAP α ⁻ клетки формируют ядро фокуса, а клетки α SMA⁻CD90⁺FAP α ⁻ и α SMA⁻CD90⁻FAP α ⁺ занимают его периферию. Интересно, что существенное количество FAP α ⁺ клеток сохраняется вплоть до стадии полного восстановления структуры ткани. Более того, именно на стадии реверсии фиброза наблюдается резкое увеличение субпопуляции CD90⁺FAP α ⁺, что позволяет предположить уникальную ремоделирующую регенераторную роль данного типа клеток.

Таким образом, мы показали, что активированные стромальные клетки принимают участие в формировании фибротических структур, начиная с ранних сроков развития фиброза. Их локализация и колокализация с другими маркерами профибротических клеток позволяет предположить ведущую роль в создании ниши для дальнейшего возникновения фибротических фокусов и последующего распространения их в ткани. На основании полученных данных очевидно, что данный тип клеток во многом обладает чертами, схожими с ФАО, в связи с чем мы предлагаем использовать для этих клеток термин фибробласты, ассоциированные с фиброзом (ФАФ) [1].

Исследование поддержано грантом РФФИ № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>.

Список литературы

1. Basalova N., Alexandrushkina N., Grigorieva O., et al. Fibroblast activation protein alpha (FAP α) in fibrosis: Beyond a perspective marker for activated stromal cells? // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, N 12. ID 1718. doi: 10.3390/biom13121718

Басина В.П.¹ ✉, Бухарова Т.Б.^{1,2}, Недорубова И.А.^{1,2}, Черномырдина В.О.^{1,2}, Меглей А.Ю.^{1,2}, Миронов А.В.^{2,3}, Васильев А.В.^{1,2}, Попов В.К.³, Гольдштейн Д.В.¹, Кулаков А.А.²

Разработка протокола получения ген-активированных остеопластических материалов с помощью трехмерной печати

¹ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

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

³ Курчатовский комплекс кристаллографии и фотоники НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ vika.basina12@gmail.com

Аннотация. Метод трехмерной печати эффективен для создания ген-активированных остеопластических материалов с заданными свойствами. В результате исследования был разработан протокол получения трехмерных матриц на основе полилактогликолидов, импрегнированных аденовирусными конструкциями.

Ключевые слова: трехмерная печать; аденовирусные векторы; полилактогликолид; ген-активированные матрицы.

Basina V.P.¹, Bukharova T.B.^{1,2}, Nedorubova I.A.^{1,2}, Chernomyrdina V.O.^{1,2}, Meglei A.Yu.^{1,2}, Mironov A.V.^{2,3}, Vasilyev A.V.^{1,2}, Popov V.K.³, Goldshtein D.V.¹, Kulakov A.A.²

Development of a protocol for obtaining gene-activated osteoplastic materials using three-dimensional printing

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

³ FSRC "Crystallography and photonics" of NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Abstract. The three-dimensional printing method is effective for creating osteogenic gene-activated matrices with specified properties. As a result of the study, a protocol was developed for the construction of three-dimensional scaffolds based on polylactoglycolides impregnated with adenovirus vectors.

Keywords: 3D printing; adenoviral vectors; polylactoglycolide; gene-activated matrices.

Введение. Перспективным направлением в генной терапии является разработка ген-активированных остеопластических материалов (ГАМ) для лечения дефектов костной ткани. Одна из проблем заключается в создании матриц, обеспечивающих эффективную доставку генетических конструкций в зону повреждения. Конструирование матриц из полилактогликолида (PLGA) с помощью трехмерной (3D) печати позволяет создать биосовместимые пористые ГАМ заданной формы для применения в ортопедии, травматологии и стоматологии.

Цель работы: разработка протокола получения ГАМ методом 3D-печати на основе PLGA, содержащих аденовирусные конструкции.

Материалы и методы. В качестве материала для формирования матриц использовали сополимер молочной и гликолевой кислот — PLGA с соотношением звеньев лактид/гликолид 75/25 и характерной вязкостью 0,7 дл/г. Для получения 10 масс.% раствора 1 г PLGA смешивали с 9 г нетоксичного растворителя — тетрагликоля с помощью магнитной мешалки в течение 2 дней при комнатной температуре. Формирование трёхмерных матриц проводили на специальном 3D-принтере, разработанном и изготовленном во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника РАН» [1]. В работе исследовали два способа импрегнации вирусных конструкций в трехмерные матрицы, полученные посредством 3D-печати. Первый

тип ГАМ был сформирован на основе раствора PLGA с добавлением на стадии печати аденовирусных частиц с геном зеленого флуоресцентного белка GFP (Ad-GFP). Вторым способом заключался в создании ГАМ путем сорбции векторных конструкций на уже сформированные матриксы из PLGA в ходе их инкубации с суспензией Ad-GFP с концентрацией вирусной ДНК 125 нг/мкл в течение 1 или 24 ч. Для исследования эффективности полученных матриксов после включения в них аденовирусных конструкций, ГАМ инкубировали с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани крыс (ММСК ЖТ) и оценивали трансдуцирующую способность Ad-GFP по продукции белка GFP, который визуально определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Количественно эффективность трансдукции ММСК ЖТ после инкубации с 3D-матриксами на основе PLGA импрегнированными Ad-GFP также анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. В экспериментах *in vivo* трансдуцирующую способность вирусов в составе матриксов исследовали при внутримышечной имплантации ГАМ крысам линии Wistar. Для выявления белка GFP проводили иммуногистохимическое окрашивание (ИГХ-окраска) парафиновых срезов, которые затем дополнительно окрашивали гематоксилином.

Результаты. Наличие трансдуцированных клеток наблюдали на 4-е сутки при культивировании ММСК ЖТ с ГАМ, полученными смачиванием матриксов суспензией Ad-GFP. В то же время не была обнаружена продукция белка GFP клетками при их инкубации вместе с ГАМ, напечатанными на 3D-принтере с использованием раствора PLGA с аденовирусными частицами. Кроме того, более эффективная трансдуцирующая способность была выявлена у трехмерных матриксов, которые инкубировали с аденовирусными векторами в течение 24 ч, по сравнению с ГАМ, импрегнированными вирусами в течение 1 ч, поэтому данный метод включения генетических конструкций в матриксы был выбран для дальнейших исследований. Методом флуоресцентной микроскопии показано, что трансдукция ММСК ЖТ при инкубации с ГАМ, сформированными из PLGA и смоченными Ad-GFP в течение 24 ч, происходит эффективно и сохраняется в течение 7 суток. Исследования методом проточной цитофлуориметрии продемонстрировали, что на 1-е сутки процент трансдуцированных клеток составляет $4,6 \pm 2,1\%$, через 4 суток данный показатель составляет $24,4 \pm 2,1\%$, а через 7 суток — $41,5 \pm 6,2\%$. В результате ИГХ-окраски на GFP парафиновых срезов, полученных после внутримышечной имплантации ГАМ, была выявлена ярко выраженная окраска макрофагов и гигантских клеток инородных тел, что свидетельствовало о поглощении ими белка к окончанию 14 суток эксперимента. Внутри пор филаментов материала также наблюдали скопление целевого белка. При этом в отдельных полях зрения наблюдали фибробластоподобные клетки с окрашенной цитоплазмой, что свидетельствовало об ещё не оконченной трансдукции клеток в ткани аденовирусными конструкциями с геном *GFP*, высвобождающимися из матриксов.

Таким образом был разработан протокол получения с помощью 3D-печати ГАМ на основе PLGA и аденовирусных конструкций, обладающих высокой трансдуцирующей способностью *in vitro* и *in vivo*, что в дальнейшем может быть использовано в генной терапии костной ткани для получения новых остеопластических материалов заданной формы с целевыми генами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант №22-15-00425.

Список литературы

1. Khvorostina M.A., Mironov A.V., Nedorubova I.A., et al. 3D printed gene-activated sodium alginate hydrogel scaffolds // Gels. 2022. Vol. 8, N 7. ID 421. doi: 10.3390/gels8070421

Басович Л.С.¹ ✉, Переpletчикова Д.А.¹, Карелкин В.В.², Малашичева А.Б.¹

Регулирование остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток путем модификации уровня экспрессии компонентов сигнального пути Notch

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² РНИИТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

✉ l.basovich@yandex.com

Аннотация. В ходе исследования было показано влияние активации / подавления компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках (HUVEC) на остеогенную дифференцировку эндотелиально-мезенхимных совместных культур, находящихся в прямом контакте.

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка; сигнальный путь Notch; сокультивирование; РНК-интерференция.

Basovich L.S.¹, Perepletchikova D.A.¹, Karelkin V.V.², Malashicheva A.B.¹

The regulation of osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by modifying the expression level of Notch signaling components

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. R.R. Vreden, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The current study showed the influence of activation / suppression of the Notch signaling pathway components in endothelial cells (HUVEC) on osteogenic differentiation of endothelial-mesenchymal co-culture being in direct contact.

Keywords: osteogenic differentiation; Notch signaling pathway; endothelial-mesenchymal co-culture; RNA-interference.

Остеогенез — сложный многоступенчатый механизм, включающий дифференцировку МСК в остеобласты и остециты и их взаимодействие для формирования и ремоделирования костной ткани. Помимо клеток мезенхимного происхождения костная ткань содержит эндотелиальные клетки типа Н. Сложная коммуникационная сеть между остеобластами и эндотелиальными клетками необходима для формирования кости и тонко сбалансирована паракринными сигнальными механизмами и прямыми клеточными контактами.

Одним из ключевых регуляторных механизмов остеогенной дифференцировки и роста кровеносных сосудов в костной ткани является сигнальный путь Notch. У млекопитающих продуцируются четыре различных рецептора Notch (NOTCH1,2,3,4) и пять лигандов (DLL1,3,4 и JAG1,2). Взаимодействие рецептора Notch с лигандом вызывает расщепление внутриклеточного домена Notch рецептора (NICD), который далее транспортируется в ядро и взаимодействует с транскрипционными факторами семейств CSL и MAML.

Целью исследования являлся анализ влияния активации/подавления компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках на остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения. В качестве клеток мезенхимного происхождения использовались культуры первичных остеобластов человека различных доноров с последующим сокультивированием с эндотелиальными клетками пупочной вены человека (HUVEC). Эндотелиальные клетки были модифицированы путем трансдукции лентивирусами, кодирующими внутриклеточный домен рецепторов Notch1,3 (N1ICD, N3ICD) для активации сигнального

пути Notch в эндотелиальных клетках, а также лентивирусами, кодирующими последовательность короткой шпилечной РНК к компонентам сигнального пути Notch: NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, JAG1, DLL4, MAML1, MAML2, MAML3, приводящие к нокадауну. Запуск остеогенной дифференцировки осуществлялся по стандартному протоколу добавлением 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата в питательную среду. Остеогенную дифференцировку анализировали с помощью окраски ализариновым красным, методом количественной ПЦР, цитохимической окраской и транскриптомным анализом.

Активация внутриклеточных доменов рецепторов Notch1,3 (N1ICD, N3ICD) в эндотелиальных клетках усиливает остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения при сокультивировании. Напротив, нокадаун рецепторов NOTCH1–4, лигандов JAG1, DLL4, а также CSL, MAML1–3 в эндотелиальных клетках в разной степени подавляет остеогенную дифференцировку эндотелиально-мезенхимной сокультуры. Наибольший ингибирующий эффект оказывает нокадаун NOTCH1,3 и MAML1. Обработка данных транскриптомного анализа методом главных компонент показала пересечение кластеров при РНК-интерференции NOTCH1,3 в эндотелиальных клетках и значительное отставание кластеров при активации сигнального пути Notch N1ICD, N3ICD с тяготением друг к другу.

Исследование выполняется при финансовой поддержке гранта РФФ № 23-15-00320.

Бахмет Е.И.

Роль белков Pcbp1 и Nanog в самообновлении и дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ e.bakhmet@incras.ru

Аннотация. В докладе будут представлены данные о функциях транскрипционных факторов Pcbp1 и Nanog в самообновлении и в дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток мыши.

Ключевые слова: Pcbp1; Nanog; Oct4; эмбриональные стволовые клетки; дифференцировка; гаструляция; энтодерма.

Bakhmet E.I.

Pcbp1 and Nanog role in self-renewal and differentiation of pluripotent stem cells

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The report will present data on the functions of Pcbp1 and Nanog transcription factors in self-renewal and differentiation of mouse pluripotent stem cells.

Keywords: Pcbp1; Oct4; Nanog; embryonic stem cells; differentiation; gastrulation; endoderm.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке во все типы соматических клеток, а также в половые клетки. Эти два свойства ПСК на ранних стадиях эмбриогенеза млекопитающих обеспечивают с одной стороны рост плода, а с другой — формирование тканей экто-, мезо-, энтодермального направлений, а также первичные половые клетки. Поддержание ПСК в недифференцированном состоянии или дифференцировка в том или ином направлении происходит благодаря работе транскрипционных факторов, которые интерпретируют внешние сигналы и активируют различные гены мишени.

ПолиЦ-связывающий белок Pcbp1 участвует в различных процессах от регуляции транскрипции до альтернативного сплайсинга. В нашей работе мы показали, что в наивных ПСК мыши, которые соответствуют эпибласту эмбриона до имплантации, Pcbp1 связывается с регуляторными сайтами гена *Oct4*, который в свою очередь кодирует одноимённый ключевой фактор ПСК. Нокаут гена *Pcbp1* в ПСК привёл к повышенному уровню дифференцировки в направлении первичной энтодермы. Дальнейший анализ показал, что в отсутствии Pcbp1 происходит дестабилизация экспрессии *Oct4*, что на фоне спонтанного выхода из плюрипотентного состояния ведёт к данному типу дифференцировки. Кроме того, мы показали, что Pcbp1 также на уровне транскрипции способствует интенсификации метаболизма аминокислот при переходе ПСК из наивного в праймированное состояние. *In vivo* такой переход происходит в клетках эпибласта в ходе имплантации эмбриона в матку. Нокаут *Pcbp1* привёл к замедленной пролиферации и гибели праймированных ПСК. Методами ChIP-seq и RNA-seq мы показали, что Pcbp1 регулирует экспрессию различных транспортных белков и ферментов, обеспечивающих импорт аминокислот, а также *de novo* синтез серина и глицина. Нарушение метаболизма аминокислот косвенно подтверждает снижение скорости синтеза белка в праймированных ПСК, а также отсутствие роста у эмбрионов мыши с нокаутом по *Pcbp1* после имплантации.

Транскрипционный фактор Nanog является одним из ключевых и отличительных маркеров ПСК. Ранее было показано, что экспрессия этого фактора снижается во время имплантации, но затем снова обнаруживается в области формирования definitivo-энтодермы. С помощью метода ауксин-индуцибельной

деградации белка нами было обнаружено, что *in vitro* элиминация Nanog в начале энтодермальной дифференцировки ПСК не отменяет данный путь развития, но приводит к значительному снижению количества энтодермальных предшественников. Далее, методом ChIP-seq нами были выявлены основные мишени Nanog в исходных наивных ПСК, в промежуточных праймированных ПСК, и в начале энтодермальной дифференцировки. Анализ данных ChIP-seq показал, что в ходе данного типа дифференцировки Nanog в основном обнаруживается у одних и тех же генов, ассоциированных с поддержанием плюрипотентности. Таким образом, мы делаем вывод о том, что механизм действия этого фактора принципиально не меняется, он не является индуктором энтодермального пути развития, а скорее необходим для сдерживания преждевременной терминальной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-75-10096.

Бахчинян Е.✉, Зиновьева А.А., Волошин Н.С., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.,
Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю.

Изменения в ПТГ-зависимых сигнальных каскадах в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках при старении

МНОИ, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ is5492@mail.ru

Аннотация. При старении в мультипотентных стромальных клетках происходит изменение преимущественных сигнальных путей, отвечающих за остеогенную дифференцировку, в ответ на стимуляцию паратиреоидным гормоном.

Ключевые слова: старение; мезенхимальные мультипотентные стромальные клетки; паратиреоидный гормон; остеогенез; кальциевая сигнализация.

Bakhchinyan E., Zinoveva A.A., Voloshin N.S., Chechekhin V.I., Tyurin-Kuzmin P.A.,
Chechekhina E.S., Kulebyakin K.Yu.

Aging related changes in PTH-dependent signal cascades in multipotent mesenchymal stromal cells

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. During aging, a shift in the preferential signaling pathways responsible for osteogenic differentiation occurs in multipotent stromal cells in response to stimulation by parathyroid hormone.

Keywords: aging; mesenchymal multipotent stromal cells; parathyroid hormone; osteogenesis; calcium signaling.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются ключевыми регуляторами гомеостаза ткани на уровне метаболитов и клеточного состава. Поддержание их гомеостатической функции осуществляется через специфичные гормоны. Основным гормоном, регулирующим ремоделирование и метаболизм костей, является паратиреоидный гормон (ПТГ). В нашей лаборатории ранее было показано, что ПТГ оказывает дуалистическое воздействие на МСК с помощью активации двух видов сигнальных каскадов: цАМФ-зависимое плавное повышение уровня внутриклеточного кальция обеспечивает проостеогенный эффект гормона, в то время как фосфолипаза С-зависимые осцилляции связаны со снижением остеогенного дифференцировочного потенциала [1]. Изменение баланса между про- и антиостеогенными сигналами может быть ассоциировано с нарушением процессов тканевого гомеостаза. Одной из наиболее распространённых причин нарушения регуляции тканевого гомеостаза является клеточное старение. В связи с этим нами было решено оценить изменение баланса между ПТГ-зависимыми сигнальными путями при старении МСК.

В качестве модели старения МСК нами использовались репликативно старые клетки (более 12 пассажей). Контрольными МСК были клетки молодых здоровых доноров на ранних пассажах. За 1–2 суток до начала эксперимента клетки в низкой плотности (20% от 100% конфлюентности) высаживали в 48-луночные планшеты. Непосредственно перед стимуляцией ПТГ клетки в течение часа окрашивали с помощью специального флуоресцентного красителя Fluo-8 в концентрации 4×10^{-6} моль/л в растворе Хэнкса с Нерес в концентрации 2×10^{-2} моль/л. Данный краситель является хелатором кальция, проникает внутрь клетки и флуоресцирует при связывании с ионом Ca^{2+} . Для стимуляции клеток использовали раствор ПТГ

в концентрации 10^{-7} моль/л. Изменение концентрации внутриклеточного кальция фиксировали по изменению интенсивности флуоресценции в каждой отдельной клетке при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti2 с камерой Kinetix, объективом Plan Fluor 10x. Стимуляция ПТГ происходила непосредственно во время съемки, так как кальциевый ответ клеток развивается достаточно быстро. Полученные кадры обрабатывали с помощью плагина ImageJ. В результате было показано, что при сопоставимом проценте ответивших клеток к общей популяции для репликативно состаренных клеток происходит увеличение количества одиночных ответов почти в 1,6 раз относительно клеток молодых доноров и сопутствующее снижение количества осциллирующих ответов на 23%.

Используя гистохимический анализ, мы показали, что репликативно старые МСК, выделенные из жировой ткани, обладают лучшей способностью к остеогенезу и меньшей способностью к адипогенезу по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом, мы показали, что при старении МСК в ответ на стимуляцию ПТГ происходит изменение преимущественных сигнальных путей, отвечающих за остеогенную дифференцировку. Наблюдаемые изменения могут лежать в основе нарушений как остеогенеза и резорбции костей, так и восстановления и обновления жировой ткани.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ (Грант № 19-75-30007, Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

Список литературы

1. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Sozaeva L., et al. Dynamic balance between PTH1R-dependent signal cascades determines its pro- or anti-osteogenic effects on MSC // Cells. 2022. Vol. 11, N 21. ID 3519. doi: 10.3390/cells11213519

Башарова К.С.¹ ✉, Безрукова А.И.^{1,2}, Григорьева Е.В.³, Копытова А.Э.^{1,2}, Байдакова Г.В.⁴, Павлова С.В.³, Милюхина И.В.^{1,5}, Медведев С.П.³, Захарова Е.Ю.⁴, Пчелина С.Н.^{1,2}, Усенко Т.С.^{1,2}

Сопоставление эффективности препаратов, направленных на восстановление активности глюкоцереброзидазы, при болезни Паркинсона, ассоциированной с мутациями в гене *GBA1*, на пациент-специфичных клетках

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова» НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБНУ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова, Москва, Россия

⁵ Институт мозга человека РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ kbasharova@yandex.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона (БП), ассоциированная с мутациями в генах *GBA1* и *LRRK2*, — самая распространенная форма БП с известной этиологией. В данной работе была сопоставлена эффективность ингибитора киназной активности *LRRK2* и фармакологических шаперонов *GCase* в восстановлении активности *GCase*.

Ключевые слова: Болезнь Паркинсона; *GBA1*; *LRRK2*; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; дофаминергические нейроны.

Basharova K.S.¹, Bezrukova A.I.^{1,2}, Grigor'eva E.V.³, Kopytova A.E.^{1,2}, Baydakova G.V.⁴, Pavlova S.V.³, Miliukhina I.V.⁵, Medvedev S.P.³, Zakharova E.Yu.⁴, Pchelina S.N.^{1,2}, Usenko T.S.^{1,2}

Comparison of the efficacy of drugs aimed at restoring glucocerebrosidase activity in parkinson's disease associated with mutations in the *GBA1* gene using patient-specific cells

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

² Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Research Center for Medical Genetics, Moscow, Russia

⁵ Institute of Human Brain of RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Parkinson's disease (PD) associated with mutations in the *GBA1* and *LRRK2* genes are the most common forms of PD with known etiology. In this study, the efficacy of an inhibitor of *LRRK2* kinase activity and pharmacological *GCase* chaperones in restoring *GCase* activity was compared.

Keywords: Parkinson's disease; *GBA1*; *LRRK2*; induced pluripotent stem cells; dopaminergic neurons.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное прогрессирующее нейродегенеративное заболевание. Мутации в гене *GBA1*, кодирующем лизосомную гидролазу глюкоцереброзидазу (*GCase*), приводят к снижению активности *GCase* и являются генетическим фактором высокого риска БП. БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (*GBA1*-БП), а также БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2* (*LRRK2*-БП), кодирующем обогащенную лейциновыми повторами киназу 2 (*LRRK2*), являются наиболее распространенными формами БП с известной этиологией. В настоящее время фармакологические шапероны (ФС) *GCase* и ингибиторы киназной активности *LRRK2* проходят 2-ю фазу клинических испытаний для терапии

GBA1-БП и LRRK2-БП соответственно. Ранее нами и другими авторами было продемонстрировано влияние ингибирования киназной активности LRRK2 на активность GCase [1, 2].

Цель исследования заключалась в оценке возможности применения ингибитора киназной активности LRRK2, MLi-2, для терапии GBA1-БП и сопоставлении эффективности MLi-2 и ФШ GCase в восстановлении активности GCase в дофаминергических нейронах, дифференцированных из пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК-ДН).

Для данного исследования была получена культура ИПСК-ДН 1 пациента с GBA-БП, 1 пациента с LRRK2-БП и 1 неврологически здорового индивидуума (контроль). ИПСК-ДН культивировали без и в присутствии селективного ингибитора киназной активности LRRK2, MLi-2 (Abcam, Англия). Активность GCase оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с тандемной масс-спектрометрией, (ВЭЖХ-МС/МС). Колокализацию GCase (Alexa Fluor 488) с лизосомным маркером LAMP-2 (Cy3) оценивали с помощью конфокальной микроскопии (Leica TCS-SP5). Относительное количество белка GCase оценивали методом ветерн-блота.

ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП характеризовались снижением активности фермента GCase и степени его транслокации в лизосомы по сравнению с контролем и LRRK2-БП ($p = 0,00019$, $p = 0,0029$; $p = 0,031$, $p = 0,0049$; соответственно). Пациенты с GBA1-БП также характеризовались тенденцией к снижению относительного уровня белка GCase в ИПСК-ДН по сравнению с контролем.

Ингибирование киназной активности LRRK2 приводило к увеличению активности GCase в ИПСК-ДН пациентов как с GBA1-БП, так и с LRRK2-БП, а также в контроле ($p = 0,013$; $p = 0,042$, $p = 0,016$ соответственно). При этом наблюдалось увеличение степени транслокации GCase в лизосомы в ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП, LRRK2-БП и контроля ($p = 0,008$, $p = 0,0031$, $p = 0,0075$ соответственно) при культивировании в присутствии MLi-2. Интересно отметить, что ингибирование LRRK2 восстанавливало активность и степень транслокации GCase в лизосомы до уровня, наблюдаемого в контроле без MLi-2 в ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП ($p > 0,05$). Относительный уровень белка GCase при культивировании ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП в присутствии MLi-2 повышался также до уровня, наблюдаемого в контроле без MLi-2 ($p = 0,008$).

Ранее нами было показано, что воздействие ФШ GCase, такими как амброксол и предложенным нами N2 (патент RU2809824C1), на ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП приводило к повышению активности и относительного уровня фермента GCase, а также степени его транслокации в лизосому [3, 4].

В ходе сопоставления действия ингибитора киназной активности LRRK2, MLi-2, и ФШ GCase, амброксола и N2, было выявлено, что ингибирование киназной активности LRRK2 приводит к повышению активности GCase до того же уровня, что и предложенный нами ранее ФШ GCase, N2, в ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП ($p > 0,05$). Воздействие амброксолом значительно увеличивало активность GCase на ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП по сравнению как с ИПСК-ДН пациентов с GBA1-БП, культивируемых с MLi-2 и N2, ($p = 0,00009$, $p = 0,00006$ соответственно), так и с ИПСК-ДН контроля, культивируемых без исследуемых соединений ($p = 0,00073$).

MLi-2 демонстрирует сопоставимую эффективность в отношении восстановления активности GCase с ФШ GCase N2, что открывает новые перспективы для разработки терапии, направленной на восстановление функции GCase. Сочетанное применение ингибиторов киназной активности LRRK2 и ФШ GCase может представлять собой новый перспективный подход для терапии GBA1-БП.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-15-00177.

Список литературы

1. Ysselstein D., Nguyen M., Young T.J., et al. LRRK2 kinase activity regulates lysosomal glucocerebrosidase in neurons derived from Parkinson's disease patients // Nat Commun. 2019. Vol. 10. ID 5570. doi: 10.1038/s41467-019-13413-w
2. Усенко Т.С., Башарова К.С., Безрукова А.И., и др. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона // Медицинская генетика. 2022. Т. 21, № 12. С. 26–29. EDN: DKTNWQ doi: 10.25557/2073-7998.2022.12.26-29
3. Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., et al. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from N370S GBA variant carriers with and without Parkinson's disease // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, N 5. ID 4437. doi: 10.3390/ijms24054437
4. Kopytova A.E., Rychkov G.N., Cheblokov A.A., et al. Potential binding sites of pharmacological chaperone NCGC00241607 on mutant β -glucocerebrosidase and its efficacy on patient-derived cell cultures in gaucher and Parkinson's disease // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, N 10. ID 9105. doi: 10.3390/ijms24109105

Безрукова А.И.^{1,2} ✉, Башарова К.С.¹, Милюхина И.В.^{1,3}, Пчелина С.Н.^{1,2}, Усенко Т.С.^{1,2}

Первичная культура макрофагов периферической крови как модель для изучения процессов аутофагии и разработки таргетной терапии для идиопатической и моногенной форм болезни Паркинсона

¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт мозга человека им. Н.П. Бехтеревой РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ bz.nastya96@gmail.com

Аннотация. Последние данные свидетельствуют о нарушении mTOR-зависимой аутофагии в патогенезе нейродегенеративного заболевания болезни Паркинсона (БП). Оценена возможность использования первичной культуры макрофагов в качестве модели для изучения нарушений аутофагии и разработки терапии для различных форм БП.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; GBA1; LRRK2; аутофагия; первичная культура макрофагов периферической крови; mTOR.

Bezrukova A.I.^{1,2}, Basharova K.S.¹, Miliukhina I.V.^{1,3}, Pchelina S.N.^{1,2}, Usenko T.S.^{1,2}

Primary culture of peripheral blood macrophages as a model for studying autophagy processes and developing targeted therapy for idiopathic and monogenic forms of Parkinson's disease

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Russia

² First Pavlov State Medical University of Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of the Human Brain RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Recent data revealed a disturbance of mTOR-dependent autophagy in the pathogenesis of the neurodegenerative disease Parkinson's disease (PD). The potential of using primary macrophage culture as a model for studying autophagy disturbances and developing therapy for various forms of PD is assessed.

Keywords: Parkinson's disease; GBA1; LRRK2; autophagy; primary peripheral blood macrophages culture; mTOR.

Болезнь Паркинсона (БП) — распространенное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется гибелью дофаминергических нейронов головного мозга и накоплением белка альфа-синуклеина. В основном БП носит идиопатический характер (ИБП). Однако существуют формы с известной этиологией. Самыми распространенными формами БП с известной этиологией является БП, ассоциированная с мутациями в гене *GBA1* (GBA1-БП), который кодирует лизосомный фермент глюкоцереброзидазу (GCase), и БП, ассоциированная с мутациями в гене *LRRK2* (LRRK2-БП), который кодирует богатую лейциновыми повторами киназу 2 (LRRK2). Молекулярные механизмы GBA1-БП и LRRK2-БП не известны, и, как следствие, нейропротекторной терапии не существует. Ранее нами в ходе анализа транскриптомов клеточной и животной моделей паркинсонизма с дисфункцией GCase было выявлено нарушение процессов аутофагии, в частности mTOR-зависимой аутофагии [1, 2]. Также было показано нарушение mTOR-зависимой аутофагии при ИБП и LRRK2-БП. На сегодняшний день активно разрабатываются препараты, направленные на снижение активности mTOR для различных нозологий, в частности на основе антисмысловых нуклеотидов [3].

Цель работы заключалась в оценке возможности использования первичной культуры макрофагов периферической крови (ПКМПК), которая широко используется нами для скрининга препаратов для терапии GBA1-БП и LRRK2-БП [4,5], в качестве модели для изучения нарушений механизмов аутофагии при БП с известной и неизвестной этиологией.

В исследование включено 11 пациентов с GBA1-БП, 3 пациента с LRRK2-БП, 20 пациентов иБП и 17 неврологически здоровых индивидуумов (контроль). От всех индивидуумов в трех повторах получены мононуклеары периферической крови путем градиентного центрифугирования в растворе плотности Фикол. Мононуклеары периферической крови культивировались в течение 5 дней в присутствии фактора роста макрофагов по протоколу, описанному нами ранее [5]. В ПКМПК оценен уровень основных белков, вовлеченных в различные этапы аутофагии, в частности mTOR-зависимой аутофагии (фосфорилированная форма mTOR (p-mTOR (Ser2448)), фосфорилированная форма RPS6 (p-RPS6 (Ser235/236)), beclin-1 (BECN1), p62, LC3B), а также различные формы лизосомной протеазы cathepsin D (CTSD) методом вестерн-блот.

Показано увеличение уровня белка ключевого инициатора аутофагии p-mTOR у пациентов с иБП по сравнению с пациентами с GBA1-БП и контролем ($p < 0,05$) и увеличение уровня p-RPS6, который является фосфорилированной формой субстрата белка mTOR — RPS6, у пациентов с GBA1-БП и LRRK2-БП по сравнению с пациентами с иБП и контролем ($p < 0,05$).

Пациенты с GBA1-БП характеризовались повышенным уровнем ключевого белка на стадии элонгации аутофагосомы BECN1 по сравнению с контролем ($p < 0,001$), что может свидетельствовать об усилении формирования аутофагосом.

Уровень LC3B-II, конъюгированная форма основного маркера формирования аутофагосом LC3B с фосфатидилэтаноламином, повышен у пациентов с GBA1-БП, LRRK2-БП, иБП по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В свою очередь, уровень белка LC3B-I, цитозольная форма LC3B, повышен у пациентов с LRRK2-БП по сравнению с пациентами с иБП и контролем ($p < 0,05$), а соотношение LC3B-II к LC3B-I повышено у пациентов с иБП по сравнению с контролем ($p < 0,01$) и снижено у пациентов с LRRK2-БП по сравнению с пациентами с GBA1-БП и иБП ($p < 0,05$). Данные результаты могут говорить об усилении формирования аутофагосом при иБП и GBA1-БП.

Интересно отметить, что уровень белка p62 понижен у пациентов с LRRK2-БП по сравнению со всеми исследуемыми группами ($p < 0,001$) и у пациентов с иБП по сравнению с контролем ($p < 0,001$), что может свидетельствовать о возможном усилении деградации аутофагосом.

Показано увеличение уровня пре-формы важного белка, участвующего в расщеплении содержимого аутолизосомы, CTSD у пациентов с GBA1-БП и иБП по сравнению контролем ($p < 0,05$). Уровень про-формы белка CTSD повышен у пациентов с LRRK2-БП по сравнению с пациентами с иБП и контролем ($p < 0,05$). Также уровень зрелой формы CTSD повышен у пациентов с LRRK2-БП по сравнению со всеми исследуемыми группами ($p < 0,05$) и понижен у пациентов с GBA1-БП по сравнению с контролем ($p < 0,01$), что может свидетельствовать о более активной лизосомной деградации в клетке при LRRK2-БП.

Впервые оценена возможность использования ПКМПК в качестве модели для изучения процессов аутофагии при моногенных и идиопатической формах БП. Показано, что ПКМПК могут отражать нарушения процессов mTOR-зависимой аутофагии при GBA1-БП, LRRK2-БП и иБП. При этом ПКМПК иБП и GBA1-БП характеризовалась более выраженным нарушением аутофагии на стадиях элонгации и формирования аутофагосом, а LRRK2-БП более выраженным нарушением лизосомной деградации. Результаты исследования расширяют представления о возможности использования ПКМПК для скрининга препаратов, направленных на восстановление процесса аутофагии при БП, в том числе и антисмысловых нуклеотидов mTOR, которые сейчас активно разрабатываются для различных нозологий.

Исследование поддержано грантом РФФИ 24-25-00212.

Список литературы

1. Usenko T., Bezrukova A., Basharova K., et al. Comparative transcriptome analysis in monocyte-derived macrophages of asymptomatic GBA mutation carriers and patients with GBA-associated Parkinson's disease // *Genes (Basel)*. 2021. Vol. 12, N 10. ID 1545. doi: 10.3390/genes12101545

2. Usenko T., Bezrukova A., Rudenok M.M., et al. Whole transcriptome analysis of substantia nigra in mice with MPTP-induced Parkinsonism bearing defective glucocerebrosidase activity // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 15. ID 12164. doi: 10.3390/ijms241512164
3. Wallings R.L., Mark J.R., Staley H.A., et al. ASO-mediated knockdown or kinase inhibition of G2019S-Lrrk2 modulates lysosomal tubule-associated antigen presentation in macrophages // *Mol Ther Nucleic Acids*. 2023. Vol. 34. ID 102064. doi: 10.1016/j.omtn.2023.102064
4. Усенко Т.С., Башарова К.С., Безрукова А.И., и др. Селективное ингибирование киназной активности LRRK2 как подход к терапии болезни Паркинсона // *Медицинская генетика*. 2022. Т. 21, № 12. С. 26–29. EDN: DKTNWQ doi: 10.25557/2073-7998.2022.12.26-29
5. Николаев М.А., Копытова А.Э., Байдакова Г.В., и др. Макрофаги периферической крови человека как модель изучения дисфункции глюкоцереброзидазы // *Цитология*. 2018. Т. 60, № 12. С. 1022–1028. EDN: VQJMGK doi:10.1134/S004137711812009X

Бекетова М.В.¹ ✉, Балышева К.Д.¹, Журиков Р.В.¹, Румянцев С.А.², Абакушина Е.В.^{1,2}

Изучение влияния различных антигенпрезентирующих клеток, экспрессирующих мембран связанный IL15 или IL21, на пролиферацию и активацию клеток натуральных киллеров человека

¹ ООО «Текон МП», Москва, Россия

² ГНЦ РФ ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

✉ mariia.beketova.bio@gmail.com

Аннотация. Иммуноterapia с использованием естественных киллеров (НК) на сегодняшний день является перспективным методом лечения онкологических заболеваний различного генеза. НК клетки можно получить в достаточном количестве при культивировании *in vitro* [1, 2]. Для этого разрабатывают технологии экспансии, генерации и активации НК клеток под действием цитокинов IL2, IL15, IL21 и при кокультивировании с антигенпрезентирующими клетками (АПК), экспрессирующими мембран связанные цитокины [3].

Ключевые слова: натуральные киллеры человека; интерлейкин 15; интерлейкин 21; культивация и активация *in vitro*.

Beketova M.V.¹, Balysheva K.D.¹, Zhurikov R.V.¹, Roumiantsev S.A.², Abakushina E.V.^{1,2}

Investigation of the effect of different antigen-presenting cells expressing membrane-bound IL15 or IL21 on the proliferation and activation of human natural killer cells

¹ Tecon MP LLC, Moscow, Russia

² Medical Endocrinology Research Center, Moscow, Russia

Abstract. Immunotherapy using natural killers (NK) is currently a promising method for treating oncological diseases of various origins. NK cells can be obtained in sufficient quantities by culturing *in vitro* [1, 2]. For this purpose, technologies are being developed for the expansion, generation and activation of NK cells under the influence of cytokines IL2, IL15, IL21 and by co-cultivation with antigen-presenting cells (APC) expressing membrane-bound cytokines [3].

Keywords: human natural killers; interleukin 15; interleukin 21; *in vitro* cultivation and activation.

Целью данного исследования было сравнить показатели пролиферации и активации НК клеток, выращенных в присутствии АПК, экспрессирующих мембран связанный IL15 или IL21. Было проведено 25 циклов культивирования с использованием АПК-IL15 и 11 циклов с АПК-IL21. Мононуклеарные клетки выделяли из периферической крови на градиенте плотности и культивировали в среде RPMI-1640 в присутствии IL2 и АПК в течение 14 дней. Методом проточной цитофлуориметрии оценивали долю НК клеток и экспрессию HLA-DR, CD38. С помощью клеточного анализатора xCELLigence оценивали цитотоксическую активность. Было показано, что НК клетки, выращенные в присутствии АПК-IL21, обладают более высоким уровнем экспрессии активационного маркера HLA-DR — 52% ($p = 0,01$) на 7-й день культивирования по сравнению с АПК-IL-15 (среднее значение 39%). Вместе с этим НК на 14-й день обладают более высокой активацией маркера цитотоксичности CD38 — 49% с АПК-IL21, нежели чем с АПК-IL15-25% ($p = 0,00004$). Также на 7-й день при кокультивации с АПК-IL21 общий индекс пролиферации был 9,09, с АПК- IL-15 достигал

в среднем 7,07 ($p = 0,02$), на 14-й день 9,2 и 10,4 соответственно. По НК клеткам индекс пролиферации к 7 дню достигал в среднем 51 для АПК-IL21 и 43,9 АПК-IL15, а к 14-му дню 11,5 и 13,8 соответственно. На 14-й день цитотоксическая активность НК клеток в отношении опухолевых мишеней при соотношении «эффе́ктор:мишень» 5:1 превышала 95% после 5 часов инкубации для всех видов АПК. Доля НК клеток для двух видов культивирования на 14-й день составляла более 85%. Таким образом показано, что технология использования АПК при генерации НК клеток позволяет получить достаточное количество активированных НК клеток. Данная разработка открывает новые возможности в развитии иммунотерапии для борьбы с онкологическими заболеваниями.

Статья подготовлена на основании результатов, полученных в ходе реализации Соглашения о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научных центров мирового уровня, выполняющих исследования и разработки по приоритетам научно-технологического развития от 20 апреля 2022 года № 075-15-2022-310.

Список литературы

1. Гельм Ю.В., Пасова И.А., Гривцова Л.Ю., и др. Опыт культивирования НК-клеток человека с фидерными клетками *in vitro* // Медицинская иммунология. 2022. Т. 24, № 3. С. 481–490. EDN: ICHISR doi: 10.15789/1563-0625-IVE-248
2. Popova L.I., Rybachuk V.A., Petrikina A.P., et al. An imaging flow cytometry method for assessment of human natural killer cells // Biomed Eng. 2022. Vol. 56, N 2, P. 96–99. doi: 10.1007/s10527-022-10175-6
3. van Vliet A.A. On the TRAIL of a killer: mechanisms of action of an allogeneic NK cell therapy. В кн.: PhDThesis. Research and graduation internal. Amsterdam: Vrije Universiteit, 2024. doi: 10.5463/thesis.720

Белик Л.А.¹⁻³ ✉, Остромышенский Д.И.², Семенова Н.Ю.¹, Бессмельцев С.С.¹, Сидоркевич С.В.¹,
Мартынкевич И.С.¹, Енукашвили Н.И.^{2,3}

Экспрессия лигандов WNT в костном мозге пациентов с множественной миеломой

¹ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, Россия

✉ l.a.belik@list.ru

Аннотация. Цель работы — оценка распределения белков семейства WNT и β -катенина в костном мозге пациентов с множественной миеломой. Показаны различия в активации каскада WNT между пациентами до и после терапии. Уровни экспрессии белков WNT и β -катенина являются критерием оценки состояния опухолевой ниши.

Ключевые слова: сигнальный путь WNT; множественная миелома; гемопоэтическая ниша; мезенхимные стромальные клетки; β -катенин; WNT3A; WNT5A; WNT10B.

Belik L.A.¹⁻³, Ostromyshenskii D.I.², Semenova N.Yu.¹, Bessmeltsev S.S.¹, Sidorkevich S.V.¹,
Martynekevich I.S.¹, Enuakashvily N.I.^{2,3}

Expression of WNT ligands in the bone marrow of patients with multiple myeloma

¹ Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

³ Cell Technologies Center «Pokrovsky», Saint Petersburg, Russia

Abstract. The aim of this study was to evaluate the distribution of WNT family proteins and β -catenin in the bone marrow of patients with multiple myeloma. Differences in the activation of the WNT cascade between patients before and after therapy are shown. The expression levels of WNT and β -catenin proteins are a criterion for assessing the tumor niche status.

Keywords: WNT signaling pathway; multiple myeloma; hematopoietic niche; mesenchymal stromal cells; β -catenin; WNT3A; WNT5A; WNT10B.

Множественная миелома (ММ) — одно из неизлечимых на данный момент опухолевых заболеваний кроветворной системы, отличающееся скоплением в костном мозге (КМ) плазматических клеток. При этом нарушается состояние гемопоэтической ниши костного мозга и её компоненты, включая мезенхимные стромальные клетки (МСК), подвергаются изменениям, приводящим к потере изначальных функций и к приобретению опухоль-ассоциированных свойств. Изменённая ниша может участвовать в развитии рецидивов ММ, что является главной проблемой в её терапии. Как и при других опухолевых заболеваниях, существенную роль в развитии ММ играет изменение активности сигнальных путей. Один из них — сигнальный путь WNT, который важен для координации работы клеток гемопоэтической ниши. Внутриклеточным посредником при канонической передаче сигналов WNT является β -катенин (кодируется геном *CTNNB1*). Изучение активности каскадов WNT при ММ требуется для оценки состояния гемопоэтической ниши, так как экспрессия лигандов WNT может быть одним из маркёров, связанных с изменением свойств МСК.

Цель работы — поиск среди белков семейства WNT потенциальных маркёров для выявления стромального опухолевого микроокружения и прогнозирования ответа на терапию.

Для биоинформатического анализа использовали опубликованные риды секвенирования для нормальных плазматических клеток и плазматических клеток при миелопролиферативных состояниях: MM, бессимптомной MM и моноклональной гаммапатии неопределённого значения. Распределение белков оценивали с помощью иммуногистохимического окрашивания срезов трепанобиоптатов костного мозга соответствующими антителами. Трепанобиоптаты пациентов с MM были ранее получены в целях диагностики при наличии информированного согласия; пациентов подразделяли на 3 группы: первично зарегистрированные, без ответа на терапию и с полным или частичным ответом на терапию. Локализацию белков в конкретных типах клеток оценивали с помощью мультиплексного флуоресцентного иммуногистохимического окрашивания (на основе принципа тирамидной амплификации сигнала): плазматические клетки идентифицировали с помощью антител к CD138, МСК — с помощью антител к альфа-гладкомышечному актину (α -SMA). Транскрипционную активность генов семейства WNT и гена *CTNNB1* в МСК костного мозга пациентов с MM оценивали с помощью qPCR.

По результатам биоинформатического анализа для различных миелопролиферативных состояний (MM и подобных) выявлена дифференциальная экспрессия для генов *WNT5A*, *WNT10B* и *CTNNB1*, которые отобрали для исследования *in situ* и *in vitro*. Также на основе литературных данных в дальнейшие исследования включили ген *WNT3A*. Иммуногистохимическое окрашивание трепанобиоптатов выявило различия в экспрессии лигандов WNT и β -катенина в костном мозге здоровых доноров и пациентов с MM. Площадь окрашивания антителами к *WNT3A* и *WNT10B* у пациентов с MM (в группе как первичных больных, так и с ответом на терапию) была, как правило, выше, чем у здоровых доноров. β -катенин при этом в больших количествах выявляли у пациентов с полным или частичным ответом на терапию, а у первичных пациентов его уровни были сопоставимы со здоровыми донорами. Для *WNT5A* значительных различий выявлено не было. Белок *WNT3A* чаще локализован в МСК гемопоэтической ниши, тогда как белки *WNT5A* и *WNT10B* в большей степени выявляли в плазматических клетках при мультиплексном окрашивании антителами. Белок β -катенин обнаруживали в обоих типах клеток. Также все перечисленные белки находили и в других типах клеток. Таким образом, белки каскада WNT присутствовали как в опухолевых клетках, так и в клетках ниши, в том числе в МСК. МСК гемопоэтической ниши пациентов, участвовавших в исследовании, были культивированы для оценки экспрессии генов интереса. Транскрипционная активность генов семейства WNT и гена *CTNNB1* в культурах МСК пациентов с разным статусом отличалась от уровней мРНК соответствующих генов у здоровых донорами, а также различалась между группами пациентов. Результаты свидетельствуют о различиях в распределении белков сигнального пути WNT между пациентами, получавшими лечение, и теми, кто его не получал, и показывают, что уровни экспрессии лигандов WNT и β -катенина являются критерием оценки состояния опухолевой ниши.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России (тема № 224012900581-4).

Белова А.Д.¹ ✉, Гусева Е.А.^{1,2}, Немец Е.А.¹, Пономарева А.С.¹, Григорьев А.М.¹, Тюрина С.А.²,
Басок Ю.Б.¹, Севастьянов В.И.^{1,3}

Получение пористого каркаса на основе продуктов ферментативной деградации децеллюляризованного хряща

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «МИРЭА — Российский технологический университет», Москва, Россия

³ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий», Москва, Россия

✉ sashak1994@mail.ru

Аннотация. Разработан пористый каркас на основе продуктов ферментативной деградации децеллюляризованного хряща свиньи с применением метода электроспиннинга. Показана высокопористая структура каркаса, а также отсутствие цитотоксических свойств.

Ключевые слова: хрящевая ткань; децеллюляризация; внеклеточный матрикс; электроспиннинг; тканевая инженерия.

Belova A.D.¹, Guseva E.A.^{1,2}, Nemets E.A.¹, Ponomareva A.S.¹, Grigor'ev A.M.¹, Tyurina S.A.²,
Basok Yu.B.¹, Sevastianov V.I.^{1,3}

Obtaining a porous framework based on the products of enzymatic degradation of decellularized cartilage

¹ Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia

² MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russia

Abstract. A porous scaffold based on products of enzymatic degradation of decellularized porcine cartilage using the electrospinning method has been developed. The highly porous structure of the scaffold and the absence of cytotoxic properties have been demonstrated.

Keywords: cartilage; decellularization; extracellular matrix; electrospinning; tissue engineering.

Лечение хрящевых дефектов остается одной из сложных клинических проблем, так как отсутствие кровоснабжения и низкий уровень метаболизма в хряще ведет к его ограниченной способности к самовосстановлению [1]. Одним из подходов к восстановлению структуры и функций хряща является создание методом электроспиннинга резорбируемых имплантатов в виде нано- и микропористых каркасов с высоким соотношением поверхности к объему [2]. Материалами для формирования каркаса могут быть как синтетические полимеры (например, полилактид, поликапролактон (ПКЛ)), так и природные полимеры (например, желатин, коллаген, гиалуроновая кислота), а также их композиты. Одним из них является децеллюляризованный свиной хрящ, в котором удалены клеточные компоненты и генетический материал, но при этом максимально сохранены компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ) [3]. Целью работы была разработка и исследование пористого каркаса на основе продукта ферментативной деградации децеллюляризованного хряща свиньи.

Децеллюляризацию микрочастиц хрящевой ткани проводили при комнатной температуре в трех сменах фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 0,1% додецилсульфат натрия и повышающуюся концентрацию Triton X-100 (1, 2, 3%), с дополнительным воздействием ультразвука [4].

Для количественного анализа гликозаминогликанов (ГАГ) образцы, лизированные в растворе папаина при +65°C в течение 12 часов, инкубировали с красителем 1,9-диметилметиленовым синим. Содержание

фибрилярного коллагена определяли с помощью набора Sircol Soluble COLLAGEN Assay kit (Biocolor, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя.

Для получения продукта ферментативной деградации навеску децеллюляризованных микрочастиц хряща свиньи (ДМХс) 20 мг лиофилизировали и инкубировали в растворе пепсина (1 мг/мл ДМХс, pH = 2.0) в течение 24 часов при комнатной температуре. Полученный продукт ферментативной деградации хряща (ПФДх) лиофилизировали.

Пористые плоские каркасы (ППК) толщиной 20 мкм изготавливали методом электроспиннинга на установке NANON-01A (MECC CO, Япония) при напряжении между электродами 25 кВ, скорости подачи раствора 4 мл/ч, расстоянии до коллектора 100 мм, скорости вращения стержня-подложки 250 об/мин, с использованием иглы 18G. Внешний и внутренний слой ППК формировали 1 мл раствора ПФДх и ПКЛ (MM 80000, Sigma-Aldrich, США) в гексафторизопропанол.

Структуру поверхности образцов ППК анализировали на сканирующем электронном микроскопе CamScan-S2 (CamScan Electron Optics, Великобритания) при ускоряющем напряжении 20 кВ. Для создания проводящего покрытия напыляли золото на установке JFC-1600 (JEOL, Япония) в течение 40 секунд при постоянном токе 5–7 мА.

Цитотоксичность образцов ППК *in vitro* оценивали на культуре фибробластов мыши линии NIH/3T3 (ATCC®CRL-1658, American Type Culture Collection) методом прямого контакта.

Для исследования функциональных свойств ППК заселяли хондроцитами человека в пробирках с полной ростовой средой, содержащей DMEM/F12 (1:1), 10% ITS+, 2 мМ L-глутамина, 1% антибиотика-антимикотика, и культивировали в стандартных условиях в течение 7 суток.

ВКМ играет важную роль в процессах адгезии, миграции и дифференцировки клеток, регулируя развитие тканей. Основными компонентам ВКМ суставной хрящевой ткани являются коллаген и протеогликаны, в состав которых входят ГАГ. В полученных ДМХс сохранялось 58 ± 6 мкг ГАГ/мг ткани, что составляло около 40% от количества ГАГ в исходной ткани (154 ± 22 мкг/мг). Также было показано, что содержание фибриллярного коллагена существенно не изменялось по сравнению с исходным суставным хрящом — 417 ± 47 мкг/мг ткани и 508 ± 103 мкг/мг ткани соответственно.

Разработанный ППК продемонстрировал высокопористую структуру поверхности, сформированную волокнами, диаметром менее 2 мкм. Размер пор был достаточным, чтобы обеспечить в дальнейшем миграцию клеток в объем каркаса. В тесте на цитотоксичность ППК показал отсутствие цитотоксического эффекта *in vitro*. Результаты по культивированию хондроцитов человека показали способность ППК положительно влиять на сохранение жизнеспособности хондроцитов человека.

Таким образом, сформированный методом электроспиннинга каркас, содержащий компоненты ВКМ хрящевой ткани, дает возможность перейти к дальнейшим исследованиям *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы

1. Hanaoka C., Fausett C., Jayabalan P. Nonsurgical management of cartilage defects of the knee: who, when, why, and how? // J Knee Surg. 2020. Vol. 33, N 11. P. 1078–1087. doi: 10.1055/s-0040-1713813
2. Niemczyk-Soczynska B., Zaszczynska A., Zabielski K., Sajkiewicz P. Hydrogel, electrospun and composite materials for bone/cartilage and neural tissue engineering // Materials (Basel). 2021. Vol. 14, N 22. ID 6899. doi: 10.3390/ma14226899
3. Немец Е.А., Лажко А.Э., Григорьев А.М., и др. Биосовместимые и функциональные свойства тканеспецифической мелкодисперсной 3D-матрицы из децеллюляризованного хряща свиньи // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2022. Т. 24, № 4. С. 73–84. EDN: AXFWMC doi: 10.15825/1995-1191-2022-4-73-84
4. Басок Ю.Б., Кириллова А.Д., Григорьев А.М., и др. Получение микродисперсного тканеспецифического децеллюляризованного матрикса из суставного хряща свиньи // Перспективные материалы. 2020. № 5. С. 51–60. EDN: MMJDCH doi: 10.30791/1028-978X-2020-5-51-60

Белова Ю.И.¹ ✉, Зубарева Т.С.^{1,2}, Панфилова А.С.^{1,2}, Федорина А.И.¹, Кветной И.М.^{1,2}

Функциональная роль митохондрий в регенерации тканей: механизмы действия и перспективы применения

¹ ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ Фтизиопульмонологии» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² АНО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

✉ bi.day.eddie@gmail.com

Аннотация. Митохондрии — важный элемент в регенерации тканей, они участвуют в производстве энергии, регуляции апоптоза и межклеточной коммуникации. Их роль в поддержании клеточной функциональности и стимуляции обновления тканей подчеркивает значимость митохондрий для клеточной активности и метаболизма.

Ключевые слова: митохондрии; регенерация; клеточный метаболизм; митохондриальный биогенез; сигнальные пути; митохондриальная регуляция; апоптоз; пролиферация; межклеточная коммуникация.

Belova Yu.I.¹, Zubareva T.S.^{1,2}, Panfilova A.S.^{1,2}, Fedorina A.I.¹, Kvetnoy I.M.^{1,2}

The functional role of mitochondria in tissue repair: mechanisms of operation and potential applications

¹ Institute of Physiopulmonology, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Mitochondria are an important component in the process of tissue regeneration. They play a key role in energy production, regulation of apoptosis and intercellular communication. Their effect on maintaining cellular functionality and stimulating tissue renewal highlights the importance of mitochondria for cellular activity and metabolism.

Keywords: mitochondria; regeneration; cellular metabolism; mitochondrial biogenesis; signaling pathways; mitochondrial regulation; apoptosis; proliferation; intercellular communication.

Митохондрии — органеллы, называемые «энергетическими станциями» клетки, производят аденозинтрифосфат (АТФ) через процесс окислительного фосфорилирования, что является критически важным для нормального функционирования клетки и выживания. Митохондрии участвуют во всех этапах регенерации тканей: репликации клеток, дифференцировке и реорганизации внеклеточного матрикса.

Кроме энергетической функции, митохондрии участвуют в регуляции клеточного цикла и апоптоза. В процессе регенерации важно, чтобы клетки могли правильно регулировать свое деление и устранять поврежденные или старые клетки, препятствующие восстановлению тканей. Митохондрии инициируют апоптоз, высвобождая цитохром С и другие проапоптотические факторы, тем самым способствуя поддержанию гомеостаза в процессе тканевой регенерации. Во время апоптоза мезенхимных стволовых клеток активируется ARTS — атипичный митохондриальный белок, который переходит из митохондрий в цитоплазму: там ARTS блокирует XIAP, мощный ингибитор апоптоза. Так, на модели мышей с дефицитом экспрессии ARTS продемонстрирована улучшенная регенерация, опосредованная преимущественно блокированием XIAP [1].

При регенерации повышается уровень активных форм кислорода (АФК), которые могут оказывать как положительное, так и отрицательное воздействие. Оптимальный уровень АФК способствует пролиферации и дифференцировке клеток, тогда как избыточное количество приводит к возникновению оксидативного стресса и повреждению клеток. Митохондрии играют ключевую роль в поддержании этого баланса,

контролируя уровень АФК и активируя антиоксидантные механизмы. При регенерации хвоста головастика *Xenopus tropicalis* выявлена индукция генов, регулирующих метаболический путь NADPH после ампутации, что указывает на продукцию АФК как важную особенность регенерации.

Также митохондрии способствуют регенерации тканей через участие в межклеточной коммуникации. Они могут влиять на микроокружение тканей путем высвобождения метаболитов, которые действуют как сигнальные молекулы, стимулирующие соседние клетки к делению и дифференцировке, помогая координировать восстановительные процессы. Так, молекулярные структуры, связанные с повреждением, продуцируемые митохондриями (mitoDAMPs), могут высвобождаться из отмирающих клеток в поврежденных тканях. MitoDAMPs служат факторами активации раннего иммунного ответа на повреждение [2]. Митохондрии способны перемещаться между клетками через микротрубочки и экзосомы, что позволяет поврежденным клеткам получать функциональные митохондрии от соседних клеток [3]. Такое межклеточное «ремонтное» взаимодействие способствует более эффективной регенерации тканей и восстановлению их функций.

Стоит отметить, что митохондрии также важны для поддержания функциональности стволовых клеток, которые играют ключевую роль в регенерации тканей. Энергия, производимая митохондриями, жизненно необходима для этих клеток для поддержания высокой пролиферативной активности и способности к дифференцировке. Так, митохондрии определяют дифференцировку стволовых клеток кишечника — подавление митохондриальной регуляции приводит к дифференцировке стволовых клеток в секреторные линии (бокаловидные клетки или клетки Панета) [4].

Митохондриальный биогенез может влиять на способности тканей к регенерации, он включает в себя процессы слияния и деления митохондрий, которые помогают поддерживать функциональность клетки и способность к выживанию. Терапия с трансплантацией митохондрий улучшает состояние поврежденного ишемией миокарда, увеличивая скорость регенерации мышц и восстановления после травмы [5]. Доказанным фактом является то, что улучшить регенерационные способности тканей можно за счет митохондриального биогенеза, стимулированного физическими упражнениями и определенным питанием.

Митохондрии участвуют в ключевых сигнальных путях, таких как Wnt/ β -катенин, Notch и PI3K/Akt/mTOR, которые регулируют процессы клеточной пролиферации и дифференцировки в ходе регенерации. Эти сигнальные пути тесно связаны с митохондриальным метаболизмом и их активность может изменяться в зависимости от состояния митохондрий. Например, ингибирование компонентов пути PI3K/Akt/mTOR полностью подавляет регенерацию волосяных фолликулов после их повреждения.

Митохондрии являются ключевым элементом в регенерации тканей, участвуя не только в производстве энергии для клеточного деления и дифференцировки, но и регуляции апоптоза, контроле уровня активных форм кислорода и межклеточной коммуникации.

Список литературы

1. Koren E., Yosefzon Y., Ankawa R., et al. ARTS mediates apoptosis and regeneration of the intestinal stem cell niche // *Nat Commun.* 2018. Vol. 9, N 1. ID. 4582. doi: 10.1038/s41467-018-06941-4
2. Nersesian S., Nelson A., Westhaver L.P., et al. Mitochondrial damage-associated molecular patterns trigger arginase-dependent lymphocyte immunoregulation // *Cell Rep.* 2022. Vol. 39, N 8. ID 110847. doi: 10.1016/j.celrep.2022.110847
3. Qin Y., Jiang X., Yang Q., et al. The functions, methods, and mobility of mitochondrial transfer between cells // *Front Oncol.* 2021. Vol. 11. ID 672781. doi: 10.3389/fonc.2021.672781
4. Ludikhuije M.C., Meerlo M., Gallego M.P., et al. Mitochondria define intestinal stem cell differentiation downstream of a FOXO/Notch axis // *Cell Metab.* 2020. Vol. 32, N 5. P. 889–900. doi: 10.1016/j.cmet.2020.10.005
5. Alway S.E., Paez H.G., Pitzer C.R., et al. Mitochondria transplant therapy improves regeneration and restoration of injured skeletal muscle // *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2023. Vol. 14, N 1. P. 493–507. doi: 10.1002/jcsm.13153

Белоглазова И.Б.¹ ✉, Зубкова Е.С.¹, Дергилев К.В.¹, Гольцева Ю.Д.^{1,2}, Ратнер Е.И.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}

Трансформация эндотелиальных клеток из ангиогенного фенотипа «трубочки» в неактивный «островки» в 2D-модели сокультивирования *in vitro*: VEGF, эфрины, Notch

¹ ФГБУ «НМИЦ им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. акад. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

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

✉ irina.beloglazova@cardio.ru

Аннотация. VEGF и эфриновая система способны переключать фенотип эндотелиальных клеток из «островков» в «трубочки», в 2D-модели сокультивирования с МСК *in vitro*, в отличие от Notch системы, которая определяет архитектуру формирования сосуда. Сигнальные системы VEGF, Notch и эфрины взаиморегулируют друг друга.

Ключевые слова: ангиогенез; сокультивирование; эфрины; Notch; VEGF; МСК; HUVEC.

Beloglazova I.B.¹, Zubkova E.S.¹, Dergilec K.V.¹, Goltseva Y.D.^{1,2}, Ratner E.I.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,2}

Transformation of endothelial cells from the angiogenic phenotype “tubes” to the inactive “islets” in the 2D *in vitro* co-culture model: VEGF, ephrins, Notch

¹ National medical research center of cardiology named after academician E.I. Chazov, Institute of Experimental Cardiology named after academician V.N. Smirnov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. VEGF and ephrin system are able to switch the phenotype of endothelial cells from “islets” to “tubes”, in 2D model of co-culture with MSCs *in vitro*, in contrast to Notch, which determines the architecture of vessel formation. VEGF, Notch and Ephrin systems mutually regulate each other.

Keywords: angiogenesis; co-culture; ephrins; Notch; VEGF; MSC; HUVEC.

В многоклеточных организмах ангиогенез — образование новых кровеносных сосудов из уже существующих — является необходимым процессом для роста и развития. Проблема регулируемого ангиогенеза остается острой не только для стимуляции ангиогенеза для регенеративных процессов, но и для его подавления при онкологических заболеваниях. Запуск ангиогенеза сопровождается трансформацией эндотелиального фенотипа из состояния «покоя» в «ангиогенное», характеризующееся повышением пролиферации и активацией клеточной миграции. Целью данной работы было изучение механизмов переключения фенотипа эндотелиальных клеток из «покоящегося» в «ангиогенный». В работе использовали эндотелиальные клетки (ЭК), полученные из пупочной вены человека (HUVEC). Мы обнаружили, что при выходе ЭК из «покоящегося» монослоя в миграционно-пролиферативное состояние изменялся экспрессионный профиль ЭК — повышалась экспрессия участников системы протеолиза, трансформировалась экспрессия элементов эфриновой и Notch систем, осуществляющих межклеточные взаимодействия [1]. Добавление мезенхимальных стромальных клеток (МСК) стимулировало формирование ЭК капиллярно-подобной сети в образованной кокультуре, что сопровождалось повышением экспрессии мРНК эндотелий-специфичных маркеров, а также белков, отвечающих за коммуникацию с МСК: PECAM-1, CLDN5, VWF, TEK, TIE1, DLL1, DLL4, NOTCH4, EFNA1, EPHB1, EPHB4, и снижением APLN, EDN1 и CCN2. Свойство МСК стимулировать

ЭК к образованию капилляро-подобной сети определяется их принадлежностью к муральным клеткам. Мы обнаружили, что при добавлении другого типа клеток, например клеточной линии HEK293T на основе эмбриональных клеток почки человека, HUVEC не формировали капилляро-подобной сети, так же, как и HEK293T не образовывали «трубочки» при сокультивировании с МСК. Более того, клетки пытались изолироваться друг от друга, формируя «островки». Основные различия в изменении профиля экспрессии HUVEC в кокультуре с МСК или с HEK293T были в белках плотных контактов, рецепторов VEGF, эфриновой и Notch систем. При этом экспрессионный профиль ЭК в «островках» отличался от профиля «покоящегося» монослоя. Чтобы оценить вклад VEGF, эфриновой и Notch систем в переключение ЭК из состояния «трубочки» в «островки» при сокультивировании с МСК, мы использовали ингибиторный анализ. Мы обнаружили, что к образованию «островков» приводит также ингибирование сигнальных путей VEGF и эфринов, в то время как подавление Notch [2] сигнализации хоть и снижало формирование почти в 2 раза, однако не приводило к переключению клеточного фенотипа из «трубочек» в «островки». Стимуляция VEGF приводила к снижению в ЭК экспрессии мРНК DLL1 и EphA4, EFNB2, что предполагает регуляцию как эфриновой так и Notch системы. В то же время использование ингибитора гамма-секретазы, подавляющего Notch сигнализацию, приводило к снижению экспрессии ряда рецепторов и лигандов эфриновой системы, а также FLT1 [3]. Ингибитор эфриновой системы (NVP-BHG712) повышал экспрессию мРНК DLL1, NOTCH1, NOTCH4, FLT1 и KDR. Полученные данные говорят о том, что сигнальные системы VEGF, Notch и эфрины взаиморегулируют друг друга. Однако, согласно нашим данным, только VEGF и эфриновая система способны переключать фенотип ЭК из «островков» в «трубочки» в 2D-модели сокультивирования с МСК, в отличие от Notch системы, которая вероятно в большей степени определяет именно архитектуру формирования сосуда. Наши результаты могут иметь важное значение для оптимизации клеточных стратегий, способствующих ангиогенезу во время репарации тканей или для подавления опухолевого ангиогенеза.

Работа выполнена при поддержке НИР, НИОКР № 124020700117-3 «Разработка васкуляризированных тканеинженерных конструкций на основе клеточных пластов для стимуляции регенеративных/репаративных процессов».

Список литературы

1. Beloglazova I., Zubkova E., Dergilev K., et al. New insight on 2D In vitro angiogenesis models: All that stretches is not a tube // *Cells*. 2022. Vol. 11, N 20. ID 3278. doi: 10.3390/cells11203278
2. Beloglazova I., Stepanova V., Zubkova E., et al. Mesenchymal stromal cells enhance self-assembly of a HUVEC tubular network through uPA-uPAR/VEGFR2/integrin/NOTCH crosstalk // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2022. Vol. 1869, N 1. ID 119157. doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.119157
3. Белоглазова И.Б., Зубкова Е.С., Дергилев К.В., и др. Эндотелиальные клетки контролируют рост сосудов, регулируя Notch-сигнализацию в мезенхимальных стромальных клетках // *Кардиологический вестник*. 2024. Т. 19, № 2-1. С. 32–38. EDN: C1FCLE doi: 10.17116/Cardiobulletin20241902132

Белый С.А.

Интракоронарное введение аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга как отдельный вид лечения пациентов с заболеваниями сердца: практический опыт 20 лет работы

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

✉ sabel1968@mail.ru

Аннотация. Представлен наш опыт применения аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга для лечения больных с осложнениями ишемической болезни сердца и дилатационной кардиомиопатией. Показана эффективность, безопасность и выполнимость предлагаемого метода в условиях стандартной клинической практики.

Ключевые слова: хроническая сердечная недостаточность; рефрактерная стенокардия; клетки костного мозга.

Bely S.A.

Intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells as a separate type of treatment for patients with heart disease: practical experience of 20 years of work

Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Our experience in using mononuclear fraction of bone marrow for the treatment of patients with complications of coronary heart disease and dilated cardiomyopathy is presented. The effectiveness, safety and feasibility of the proposed method in standard clinical practice have been demonstrated.

Keywords: chronic heart failure; refractory angina; bone marrow cells.

Заболевания сердца остаются серьезной проблемой современного здравоохранения. Бесспорный лидер здесь — это осложнения ишемической болезни сердца (ИБС). В Российской Федерации на 2018 год зарегистрировано более 12 млн пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), 4,5 млн человек имеют III–IV ФК с соответствующим прогнозом и без возможности их охвата хирургическим лечением [1]. Неоперабельный характер поражения коронарных артерий, а также рецидив заболевания после современных методов реваскуляризации создает еще одну проблему — группу больных с рефрактерной стенокардией (1,2 млн человек) без хирургических опций. Вторая (около 1 млн человек) после ИБС причина тяжелой ХСН и первая для выполнения трансплантации сердца — дилатационная кардиомиопатия. Интракоронарное введение аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга (АМФКМ) — перспективный метод хирургического лечения таких заболеваний сердца. Эффективность применения АМФКМ у таких пациентов связана с улучшением процессов кровоснабжения миокарда, уменьшением апоптотической гибели кардиомиоцитов, фиброза в миокарде, появлением новых сократительных клеток, иммуномодулирующим действием [2]. В отличие от существующих методов хирургического лечения (реваскуляризации, ресинхронизирующей терапии, трансплантации и механической поддержки сердца) данный метод теоретически может быть выполнен значительному количеству пациентов. Нашей научной группой разработан метод трехсосудистого неокклюзионного интракоронарного введения АМФКМ, и с 2003 года 302 пациента с заболеваниями сердца получили это лечение. Из них 122 пациента с постинфарктной ХСН [3]. Через 5 лет выживаемость пациентов из клеточной группы была в 2 раза выше, чем в контрольной. Также отмечалось значимое улучшение качества жизни этих тяжелых пациентов. Мы имеем опыт лечения 145 пациентов

с рефрактерной стенокардией. У 86% из них произошло улучшение кровоснабжения сердца и снижение функционального класса стенокардии, увеличение толерантности к физической нагрузке и значимое улучшение качества жизни. Хорошие результаты лечения были получены у 35 пациентов с ДКМП. Удивительно, но в раннем послеоперационном периоде в группах наших пациентов не было ни летальных исходов, ни каких-либо осложнений вообще. Важно подчеркнуть, что 20 лет наблюдения за пациентами не выявили каких-либо специфических осложнений, в том числе повышенного риска онкологических заболеваний, тяжелой орган-специфической кальцификации и фиброза. Дальнейшее развитие данного направления, на наш взгляд, связано с повторными циклами интракоронарного введения клеток АМФКМ у больных с ДКМП. Мы уже имеем такой опыт у 7 пациентов с терминальной стадией заболевания. Почти у 60% таких больных мы добились полного восстановления сердца, у 20% значительное улучшение его сократимости. Считаем перспективным применение разработанного метода в раннем постинфарктном периоде для профилактики развития постинфарктной ХСН и предотвращения тяжелого, малообратимого ремоделирования сердца в будущем. Полученные нами данные совпадают с данными зарубежных авторов. 22 системных обзора (2012–2022) показали эффективность и безопасность применения клеток костного мозга у больных с постинфарктной ХСН, часть этих работ отметила увеличение выживаемости. Данные 13 зарубежных исследований, в которые суммарно был включен 841 пациент с рефрактерной стенокардией, в целом подтверждают эффективность применения клеток костного мозга.

Список литературы

1. Министерство Здравоохранения РФ. Российское кардиологическое общество. Хроническая сердечная недостаточность. Клинические рекомендации. Москва, 2020.
2. Banerjee M.N., Bolli R., Hare J.M. Clinical studies of cell therapy in cardiovascular medicine: Recent developments and future directions // *Circ Res*. 2018. Vol. 123, N 2. P. 266–287 doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311217
3. Белый С.А., Комок В.В. Клеточная терапия ХСН // *Кардиология*. 2018. Т. 58, № S4. С. 46–54. EDN: XMGUBV doi: 10.18087/cardio.2442

Белый С.А.

Восстановление сердца у больных дилатационной кардиомиопатией после повторных циклов интракоронарного введения аутологичных моноклеарных клеток костного мозга

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

✉ sabel1968@mail.ru

Аннотация. Применение повторных циклов интракоронарного введения аутологичной моноклеарной фракции костного мозга для лечения пациентов с дилатационной кардиомиопатией и выраженной кардиомегалией показало принципиальную возможность полного восстановления сердца у значительной части таких пациентов.

Ключевые слова: дилатационная кардиомиопатия; кардиомегалия; сердечная недостаточность; клетки костного мозга.

Bely S.A.

Heart recovery in patients with dilated cardiomyopathy after repeated cycles of intracoronary administration of autologous bone marrow mononuclear cells

Academician I.P. Pavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The use of repeated cycles of intracoronary administration of mononuclear fraction of bone marrow cells for the treatment of patients with dilated cardiomyopathy and severe cardiomegaly has shown the fundamental possibility of complete cardiac recovery in a significant proportion of such patients.

Keywords: dilated cardiomyopathy; cardiomegaly; heart failure; bone marrow cells.

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) — заболевание сердца, которое проявляется тяжелой сердечной недостаточностью и часто приводит к трансплантации сердца или смерти пациента. Число таких больных в РФ более 1 млн. Необходима разработка новых методов хирургического лечения ДКМП. Появляется все больше данных об эффективности интракоронарного применения клеток аутологичной моноклеарной фракции костного мозга (АМФКМ) у пациентов с ДКМП [1, 2]. На данный момент повторное введение клеток АМФКМ выполнено 7 пациентам. Средний возраст составил 48 ± 8 лет. Мужчин 6, женщин 1. Длительность заболевания до первого интракоронарного введения АМФКМ составила в среднем 3 года. Исходный функциональный класс ХСН III (230 метров). Исходная фракция выброса (ФВ) левого желудочка (ЛЖ) составила $25 \pm 10\%$. Повторные интракоронарные введения выполнены в сроки от 9 до 20 месяцев, в среднем через 15 месяцев от первого введения. Длительность наблюдения за больными составила в среднем 4 года. Всем пациентам выполнялось ЭХОКГ (vivid7) исследование, однофотонная компьютерная томография (ОФЭКТ) с технетрилом для оценки перфузии миокарда. На настоящий момент результаты повторного введения АМФКМ можно оценить у 7 пациентов. У 6 произошло восстановление сократительной функции ЛЖ. У 4 из них — полная нормализация размеров сердца. Средняя фракция выброса составила 54%. Функциональный класс ХСН I (450 метров). Отмечалось прогностически значимое снижение NTproBNP у всех пациентов. По данным ОФЭКТ миокарда с технетрилом исходные показатели перфузии и сократимости ЛЖ значительно улучшились в динамике. Первые результаты показывают, что повторные циклы интракоронарного введения АМФКМ приводят к восстановлению сократительной функции ЛЖ у более 80% больных с ДКМП.

При этом у более 50% пациентов происходит нормализация размеров сердца. Планируется дальнейший набор пациентов, изучение полученных результатов, и возможно появление нового эффективного метода лечения этой категории пациентов.

Список литературы

1. Bolli R. Repeated cell therapy: a paradigm shift whose time has come // *Circ Res.* 2017. Vol. 120, N 7. P. 1072–1074. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310710
2. Белый С.А., Лукашенко В.И., Комок В.В., Хубулава Г.Г. Клеточная терапия в комплексном лечении пациента с ДКМП. Клиническое наблюдение // *Кардиология.* 2019. Т. 59, № S4. С. 59–64. EDN: NMLSES doi: 10.18087/cardio.2555

Беляева А.А.¹, Перепелина К.И.^{1,2}, Кузнецова Е.А.¹, Смирнова Д.В.¹, Костарева А.А.², Васичкина Е.С.², Переплетчикова Д.А.¹, Малашичева А.Б.^{1,2}

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки, полученные от пациента с синдромом Синглтона–Мертена, как платформа для создания модели изучения патологической кальцификации

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

✉ anna.myruleva.a@gmail.com

Аннотация. Были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки от пациента с синдромом Синглтона–Мертена. Линия SMS-DDX58_1 имеет однонуклеотидную замену в гене *DDX58*, характерную для заболевания, предоставляя возможность для создания модели для изучения механизмов кальцификации при этом синдроме.

Ключевые слова: синдром Синглтона–Мертена; патологическая кальцификация; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Belyaeva A.A.¹, Perepelina K.I.^{1,2}, Kuznetsova E.A.¹, Smirnova D.V.¹, Kostareva A.A.², Vasichkina E.S.², Perepletchikova D.A.¹, Malashicheva A.B.^{1,2}

Patient-derived induced pluripotent stem cells from an individual with Singleton–Merten syndrome as a model platform for studying pathological calcification

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Federal State Budgetary Institution “V.A. Almazov National Medical Research Center” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

Abstract. iPSCs from a Singleton–Merten syndrome patient were obtained to study pathological calcification. The SMS-DDX58_1 line expresses pluripotency markers and has a *DDX58* mutation, providing a model for understanding calcification mechanisms in this syndrome.

Keywords: Singleton–Merten syndrome; pathological calcification; induced pluripotent stem cells.

Синдром Синглтона–Мертена — ауточомное доминантное заболевание, затрагивающие многие системы органов. Для пациентов с этим диагнозом характерно развитие дисплазии зубов, кальцификация аорты, аномальное развитие скелета, глаукома, псориаз и ранний остеопороз. Генетической основой синдрома считаются однонуклеотидные замены в генах *IFIH1* и *DDX58*. Белки MDA5 и RIGI, кодируемые этими генами, в норме принимают участие в активации противовирусного ответа в клетке. Замена в гене *DDX58* характерна для людей с атипичным развитием синдрома Синглтона–Мертена [1]. При таком течении болезни наблюдается нормальный зубной ряд, однако патологическая кальцификация, глаукома и другие признаки заболевания диагностируются в раннем возрасте, как и при типичном течении синдрома. Молекулярные механизмы возникновения патологической кальцификации сердечно-сосудистой системы и образования других проявлений синдрома Синглтона–Мертена не до конца ясны.

Получение индуцированных плюрипотентных клеток (иПСК) от пациента с синдромом Синглтона–Мертена для создания модельной системы изучения патологической кальцификации было целью работы.

При репрограммировании мононуклеарных клеток периферической крови пациента с синдромом Синглтона–Мертена была получена линия iPСК-SMS-DDX58_1. При иммуноцитохимическом исследовании линии SMS-DDX58_1 было установлено, что клетки экспрессируют маркеры плюрипотентности SSEA4, OCT4 и NANOG. Полученные клетки положительны по окраске на щелочную фосфатазу. SMS-DDX58_1 демонстрирует сходный уровень экспрессии мРНК генов *Nanog*, *POU5F1*, *Sox2* в сравнении с контрольными iPСК линии AD3. Линия полученных iPСК демонстрирует способность дифференцироваться в направлении трех зародышевых листков.

Было проведено секвенирование по Сэнгеру ДНК полученной линии iPСК, которое выявило наличие специфичной для пациента однонуклеотидной замены в 7 экзоне гена *DDX58* с.902C>G в гетерозиготном состоянии, приводящий к аминокислотной замене р.Р301R. Идентичность iPСК была подтверждена с помощью STR-анализа.

Пациент-специфичные iPСК, полученные в ходе работы, будут использованы для создания модельной системы для изучения патологической кальцификации у пациентов с синдромом Синглтона–Мертена.

Работа выполнена при поддержке НЦМУ «Центр персонализированной медицины».

Список литературы

1. Jang M.-A., Kim E.K., Now H., et al. Mutations in DDX58, which encodes RIG-I, cause atypical Singleton–Merten syndrome // *Am J Hum Genet.* 2015. Vol. 96, N 2. P. 266–274. doi: 10.1016/j.ajhg.2014.11.019

Бернарделли Л.И.¹✉, Емелин А.М.², Индейкин Ф.А.³, Деев Р.В.^{1,2}

Регенерация клеток эпителия при воспалительных заболеваниях кишечника

¹ ФГБОУ ВО «Северо-западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Научно-исследовательский институт морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ Национальный Центр Клинической Морфологической диагностики, Санкт-Петербург, Россия

✉ bernardellimita@gmail.com

Аннотация. Нарушение регенерации эпителия слизистой оболочки кишки лежит в основе патогенеза воспалительных заболеваний кишечника. Рассогласование в иммунно-эпителиальном взаимодействии приводит к нарушению специфических функций эпителия.

Ключевые слова: регенерация слизистой оболочки кишечника; болезнь Крона; язвенный колит.

Bernardelli L.I.¹, Emelin A.M.², Indeikin F.A.³, Deev R.V.^{1,2}

Regeneration of epithelial cells in inflammatory bowel diseases

¹ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

² Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

³ National Center for Clinical Morphological Diagnostics, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Impaired regeneration of the epithelium of the intestinal mucosa underlies the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. A mismatch in the immune-epithelial interaction leads to a violation of the specific functions of the epithelium.

Keywords: regeneration of the intestinal mucosa; Crohn's disease; ulcerative colitis.

Актуальность. Воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) (болезнь Крона (БК) и язвенный колит (ЯК)) — это заболевания, при которых происходит повреждение, воспаление и нарушение нормальной репарации слизистой оболочки (СО) кишки. При ВЗК эпителиальные клетки проходят повторяющиеся циклы восстановления после повреждения [1, 2]. Иммунные клетки играют решающую роль в регенерации стволовых клеток и восстановлении СО. Заживление является новой терапевтической целью [3].

Цель исследования. Определить особенность регенерации эпителия СО кишки при ВЗК. Материал для исследования — биоптаты пациентов с синдромом раздраженного кишечника (СРК) ($n = 20$) и ВЗК ($n = 96$), полученные при колоноскопии из подвздошной, восходящей ободочной, сигмовидной и прямой кишок. Определили морфометрические особенности строения СО кишечника. Выполнили иммуногистохимические реакции с антителами к Ki-67, Chromogranin A, CD3, CD20, CD138, CD163, CD68, CD117. Провели подсчет пролиферирующих, бокаловидных, клеток Панета, энтерохромаффинных клеток на 100 эпителия; число лимфоцитов, макрофагов, тучных клеток в поле зрения ($\times 400$). Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей Me [Q_1 ; Q_3], использовали критерии Манна-Уитни, Краскела-Уоллиса, Спирмена.

Результаты и обсуждение. Деформация крипт ассоциировала с ЯК в стадии обострения ($p = 0,0407$). Проллиферативная активность выше при ВЗК по сравнению с СРК. Корреляционный анализ ИП и клеток инфильтрата показал наличие связей: с CD138 при СРК в подвздошной ($r = -0,62$, $p < 0,05$), сигмовидной кишках ($r = 0,63$, $p < 0,05$); с CD163 при БК в стадии ремиссии ($r = -0,65$, $p < 0,05$) в подвздошной кишке; с CD163 ($r = -0,67$, $p < 0,05$), CD3 ($r = 0,8$, $p < 0,05$) при БК в стадии обострения в проксимальных

и дистальных отделах кишки; при ЯК в стадии ремиссии с CD20 ($r = -0,82, p < 0,05$), CD3 ($r = 0,63, p < 0,01$), CD163 ($r = 0,57, p < 0,01$) в дистальных отделах; при ЯК в стадии обострения корреляционные связи отсутствовали. Показали увеличение числа бокаловидных, эндокринных клеток при БК, снижение числа бокаловидных клеток при ЯК. Увеличение числа бокаловидных клеток при БК в крипте ≥ 12 ($p = 0,0137$) в восходящей ободочной кишке; в крипте ≥ 18 и в поверхностном эпителии ≥ 16 в сигмовидной кишке; снижение числа бокаловидных клеток в крипте < 17 ($p = 0,0214$) при ЯК в восходящей ободочной кишке являются предикторами обострения. Относительный риск возникновения фазы обострения при БК увеличивался при ИП $< 50\%$ в 1,7 раза ($p = 0,05$) в подвздошной кишке, при ИП ≥ 36 в 1,86 раза ($p = 0,048$) в восходящей ободочной кишке; для ЯК при ИП $< 38\%$ в 12,13 раза ($p < 0,0001$) в подвздошной кишке, при ИП $< 24\%$ в 17,88 раз ($p < 0,0001$) в сигмовидной кишке. Изменение числа метаплазий клеток Панета в отделах толстой кишки ассоциировано с обострением при БК и ЯК.

Выводы. Нарушение регенерации слизистой оболочки кишки при ВЗК проявляется в изменении архитектуры крипт, нарушении стабильности эпителиального пласта, при ЯК в дистальных, при БК в проксимальных отделах кишки. Важным критерием полноценной регенерации является эффективное восстановление функциональных единиц. Повышение пролиферативной активности при ВЗК не приводит к эффективной репарации. Рассогласование в иммунно-эпителиальном взаимодействии нарушает специфические функции эпителия.

Список литературы

1. Wang Y., Chiang I.-L., Ohara T.E., et al. Culture captures injury-repair cycles of colonic stem cells // Cell. 2019. Vol. 179, N 5. P. 1144–1159. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.015
2. Brazil J.C., Quiros M., Nusrat A., Parkos C.A. Innate immune cell-epithelial crosstalk during wound repair // J Clin Invest. 2019. Vol. 129, N 8. P. 2983–2993. doi: 10.1172/JCI124618
3. Hou Q., Huang J., Ayansola H., et al. Intestinal stem cells and immune cell relationships: potential therapeutic targets for inflammatory bowel diseases // Front Immunol. 2021. Vol. 11. ID 623691. doi: 10.3389/fimmu.2020.623691

Бескина В.Э., Околитенко М.С.✉, Горбулич А.В.

Гистотопография тучных клеток в тканях кожи после однократного воздействия рентгеновского облучения

Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ matveyoko@mail.ru

Аннотация. Выявленные гистотопографические особенности реактивных изменений клеточного дифферона тучных клеток (тканевых базофилов) в тканях кожи в норме и эксперименте могут быть использованы в качестве критерия определения динамики и характера течения радиационно-индуцированных процессов.

Ключевые слова: радиация; рентгеновское облучение; реактивность и гистотопография; кожный покров; тучные клетки; дегрануляция.

Beskina V.E., Okolitenko M.S., Gorbulich A.V.

Histotopography of mast cells in skin tissues after a single exposure to X-ray irradiation

S.M. Kirov Military medical academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The revealed histotopographic features of reactive changes in the cellular differon of mast cells (tissue basophils) in skin tissues in norm and experiment can be used as a criterion for determining the dynamics and character of the course of radiation-induced processes.

Keywords: radiation; X-ray exposure; reactivity and histotopography; skin; mast cells; degranulation.

Кожа — орган, занимающий пограничное положение, всегда первым подвергается радиационному воздействию. Ведущие клеточные диффероны тканей кожного покрова — эпителиальный, фибробластический и эндотелиальный — образуют единую систему, регенеративные свойства которой определяются интегративной деятельностью всех клеток-участниц постлучевого восстановления, в том числе и тучных клеток (тканевых базофилов). Тканевые базофилы влияют на активность фибробластов и кератиноцитов, а также на состояние сосудистого компонента как в норме, так и в условиях клеточной гибели, что отражается на эффективности барьерно-защитной функции кожного покрова [1].

Цель исследования — оценить гистотопографические особенности внутридифферонной гетероморфии тучных клеток в тканях кожи в норме и после однократного рентгеновского воздействия.

Эксперимент выполнен на половозрелых мышах-самцах ($n = 10$). Острую лучевую болезнь моделировали с помощью установки РУМ-17. Поглощённая доза составила 7,8 Гр (летальная доза для мышей). Контрольная группа состояла из интактных животных. Материал фрагментов кожи межлопаточной области подвергался обработке по стандартной методике изготовления полутонких гистологических срезов толщиной 1 μm на приборе Ultramicrotome РТ-РС и окрашивался толуидиновым синим. Морфологические особенности популяции тканевых базофилов анализировали в 10 полях зрения бинокулярного микроскопа Axio ScopeA1 с учетом гистотопографии кожи. Различали дифференцирующиеся (клетки в состоянии покоя, ТК_д), недегранулированные (ТК_{нр}) и с разной степенью дегранулированные (ТК_{др}) тучные клетки. Обработку данных и подсчета тканевых структур осуществляли с помощью лицензионной программы Zen 2.3.

В коже интактной группы животных в сосочковом слое дермы, толщина которого равнялась 10–20 μm , преобладали недегранулированные тучные клетки (ТК_{нр} = $1,9 \pm 1,1$). Морфологически они определялись с полнотой заполненными метакроматичными гранулами [2]. Также изредка встречались дифференцирующиеся

и дегранулированные тканевые базофилы. В сетчатом слое дермы (80–120 μm) возрастала внутридифферонная гетероморфия клеток: они встречались на разных этапах дифференцировки. Среднее количество $\text{TK}_{\text{нр}}$ равнялось $4,4 \pm 2,4$. Дегранулированные тканевые базофилы представлены клетками, в которых цитоплазма не полностью заполнена гранулами и их высвобождение протекало путем экзоцитоза. Они отличались большими размерами, ярко выраженными тинкториальными свойствами и полиморфизмом в связи с высокой и низкой степенью дегрануляции. Количество $\text{TK}_{\text{др}}$ с частичным опустошением гранул составило $1,4 \pm 0,8$, а с полным — $2,8 \pm 1,4$. При этом последние чаще встречались вокруг сально-волосяных комплексов и на границе дермы и гиподермиса. Дифференцирующиеся клетки характеризовались небольшими размерами и более малочисленной зернистостью в цитоплазме. Количество $\text{TK}_{\text{д}} = 2 \pm 1$. В прослойках соединительной ткани и вокруг сосудисто-нервных пучков гиподермиса (150–300 μm) преимущественно диагностировались клетки с высокой степенью дегрануляции ($\text{TK}_{\text{др}} = 1,7 \pm 0,9$). Представительство других, периваскулярно расположенных тканевых базофилов, встречалось реже.

По результатам обработки морфологических данных на 9-е сутки после однократного рентгеновского облучения с поглощенной дозой 7,8 Гр выявлено полное отсутствие тучных клеток в сосочковом слое дермы (10–20 μm). В нижележащем сетчатом слое (100–140 μm) снижалась внутридифферонная гетероморфия тканевых базофилов: диагностировались только недегранулированные ($\text{TK}_{\text{нр}} = 3,6 \pm 1,2$) и частично дегранулированные ($\text{TK}_{\text{др}} = 1,3 \pm 0,6$) клетки, причем последние располагались только в глубоких слоях дермы. Также встречались «атипичные» тканевые базофилы с крайне гиперхромной сморщенной цитоплазмой. В их экстрацеллюлярном матриксе метахроматические гранулы отсутствовали. Количество таких клеток снижалось по мере залегания в дерме [3]. В гиподермисе (200–250 μm) внутридифферонная гетероморфия тучных клеток возрастала относительно вышележащих слоев. Количество $\text{TK}_{\text{нр}} = 2,7 \pm 0,8$; $\text{TK}_{\text{др}}$ с частичной дегрануляцией = $1,4 \pm 0,7$; $\text{TK}_{\text{д}}$ с полной дегрануляцией = $1,8 \pm 1,4$. Изредка встречались клетки в состоянии покоя. Большинство $\text{TK}_{\text{др}}$ располагалось по ходу кровеносных сосудов и нервов. Они имели вытянутую веретеновидную форму и тесно прилегали к адвентиции сосудов и эпиневирию нервов.

Таким образом, тучные клетки в интактной группе животных встречались в каждом из исследуемых участков кожи с преобладанием всех типов клеток в сетчатом слое дермы (область сально-волосяных комплексов), что может свидетельствовать об их широкой сфере функциональных отправлений [3]. В гиподермисе $\text{TK}_{\text{др}}$ встречались преимущественно периваскулярно и периневрально. В эксперименте гетероморфия тканевых базофилов возрастала от поверхностных к глубоким слоям кожи. Встречались реактивно измененные — «атипичные» клетки. Интенсивная дегрануляция присутствовала только в гиподермисе. Выявленные результаты подтверждают изменение функциональной активности и распределения тучных клеток в ответ на рентгеновское воздействие.

Список литературы

1. Аралова М.В., Атякшин Д.А., Глухов А.А., и др. Тучные клетки как отдельный компонент процесса репарации ран // Журнал анатомии и гистопатологии. 2018. Т. 7, № 2. С. 103–109. EDN: XRLCRF
2. Одинцова И.А., Миргородская О.Е., Русакова С.Э., Слуцкая Д.Р. Внутридифферонная гетероморфия тканевых базофилов в регенерационном гистогенезе // Известия Российской военно-медицинской академии. 2020. Т. 39, № S3-1. С. 115–119. EDN: VIKKOC
3. Komi D.E.A., Khomtchouk K., Santa Maria P.L. A Review of the contribution of mast cells in wound healing: involved molecular and cellular mechanisms // Clin Rev Allergy Immunol. 2019. Vol. 58. P. 298–312. doi: 10.1007/s12016-019-08729-w

Бигильдеев А.Е.^{1,2} ✉, Булыгина Е.С.³, Цыганкова С.В.³, Илларионова О.И.⁴, Лядова И.В.⁴

Предварительное повреждение стромы костного мозга у мышей способствует приживлению донорских стромальных клеток-предшественниц после их внутривенного введения

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

✉ bigildeev.ae@gmail.com

Аннотация. Костный мозг (КМ) мышей-самцов вводили внутривенно сингенным мышам-самкам, облученным в дозах 6,5 Гр и 13 Гр, и необлученным особям. С помощью ПЦР на ген, сцепленный с Y-хромосомой, показано присутствие донорских стромальных клеток в КМ у мышей, облученных в большей дозе, но не в остальных группах.

Ключевые слова: МСК; трансплантация МСК; КОЕф; облучение.

Bigildeev A.E.^{1,2}, Bulygina E.S.³, Tsygankova S.V.³, Illarionova O.I.⁴, Lyadova I.V.⁴

Preliminary damage to bone marrow stroma in mice promotes engraftment of donor stromal progenitor cells after their intravenous administration

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University). Moscow, Russia

³ NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Bone marrow (BM) from male mice was injected intravenously into syngeneic female mice irradiated at doses of 6.5 Gy and 13 Gy and unirradiated ones. PCR for the Y-chromosome-linked gene showed the presence of donor stromal cells in the BM of mice irradiated only at a higher dose.

Keywords: MSC; MSC transplantation; CFU-f; irradiation.

Полноценная регенерация стромы костного мозга (КМ) как результат её трансплантации с помощью внутривенного введения стромальных клеток на сегодняшний день считается невыполнимой задачей. Ранние исследования постулировали, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) не способны к приживлению после их внутривенного введения в организм реципиента. Вместе с тем недавние работы не подтвердили этот постулат [1–4]. К сегодняшнему дню показаны многие принципиальные элементы, позволяющие надеяться на успешную трансплантацию МСК посредством их системного введения, а именно:

- способность МСК сохранять свою функциональность после их разобобщения и внутривенного введения в организм реципиента [1];
- способность МСК, введенных внутривенно, к заселению костного мозга за счет специализированных молекулярных механизмов [2, 3];
- способность донорских аллогенных МСК длительное время выживать в организме реципиента [4];
- иммунные привилегии МСК, то есть их способность выживать несмотря на активированную против их антигенов иммунную систему реципиента [5].

Это создает фундаментальную основу для разработки методов по созданию протоколов эффективной трансплантации МСК и замещения стромы КМ у пациентов с гематологическими заболеваниями, в том числе с онкологией, а также у пациентов с заболеваниями скелета, в том числе генетическими. Мы предположили, что одной из причин отсутствия значительного успеха в предпринимаемых ранее попытках трансплантации МСК являлось то, что строма КМ реципиента оставалась относительно сохранной, в то время как функцией стволовых клеток является физиологическое поддержание какого-либо органа или ткани или их регенерация в случае утраты функциональности. Сигналы, поступающие от поврежденного органа или ткани, или отсутствие сигналов как таковых может служить триггером для активации стволовых клеток. Исходя из этого, мы предположили, что если целенаправленно повредить строма КМ реципиента перед введением ему МСК донора, то это должно привести к активации последних и к более эффективному приживлению донорских клеток. Для проверки этой гипотезы мышей-самок линии B10 облучали в двух дозах: 6,5 Гр (сублетально, $n = 5$) и 13 Гр (летально, $n = 5$). Контрольную группу составили необлученные мыши той же линии, пола и возраста ($n = 5$). В тот же день облученным мышам вводили суспензию клеток КМ от мышей-самцов той же линии и того же возраста (по 16×10^6 клеток/мышь). Контрольным мышам также вводили клетки КМ от самцов по 30×10^6 клеток/мышь. Через 30 дней КМ животных извлекали из бедренных костей и сажали несколько флаконов КОЕф в стандартных культуральных условиях (среда α MEM + 20% ЭТС). Через 3 недели флаконы окрашивали кристалл-виолетом и подсчитывали колонии КОЕф с помощью монокулярной лупы. Клетки открепляли от пластика 0,25% раствором трипсина, отмывали и окрашивали моноклональными антителами к CD45 CD45. Стромальные CD45^{neg} клетки были отсортированы на клеточном сортере BD FACSAriaIII и использованы для выделения ДНК. Методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени на ген *Prssly*, расположенный на Y-хромосоме, и ген *Gapdh*, расположенный на аутосомной хромосоме, по разнице пороговых циклов определяли долю клеток донора среди стромальных клеток КМ реципиента, используя для этого калибровочную кривую, полученную с помощью серийных разведений ДНК самца и ДНК самки.

После облучения в дозе 13 Гр, несмотря на большую дозу клеток КМ донора, введенную для восстановления кроветворения, 2 мыши пали. От всех остальных мышей были успешно получены КОЕф. Среди CD45^{neg} субпопуляции прикрепленных клеток подслоя во флаконах с КОЕф, полученных из КМ необлученных ($n = 5$) и облученных в дозе 6,5 Гр ($n = 5$) мышей-реципиентов, по данным ПЦР в реальном времени, не было выявлено донорских клеток с гаплотипом XY. Из трёх выживших мышей-реципиентов, облученных в дозе 13 Гр, в одном случае была выявлена донорская ДНК. Доля донорских стромальных клеток в этом образце составила 1,4%. Это означает, что донорские стромальные клетки-предшественницы, предположительно МСК, оказались способны осуществить хоминг в КМ мышей-реципиента и выжить там в течение 1 месяца после введения, даже при условии их предварительного разобщения и внутривенного введения. Совокупность двух фактов, а именно: 1) отсутствие донорских стромальных клеток в КМ необлученных и сублетально облученных мышей-реципиентов в 10/10 случаев и 2) наличие сигнала от донорских клеток в одном из трех летально облученных реципиентов, — говорит в пользу того, что более сильное повреждение стромы способствует активации стромальных клеток-предшественниц, в том числе, вероятно, и МСК, и приводит к их более эффективному приживлению.

Список литературы

1. Piersma A.H., Ploemacher R.E., Brockbank K.G.M. Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route // ВЖНаем. 1983. Vol. 54, N 2. P. 285–290. doi: 10.1111/j.1365-2141.1983.tb02097.x
2. Devine S.M., Bartholomew A.M., Mahmud N., et al. Mesenchymal stem cells are capable of homing to the bone marrow of non-human primates following systemic infusion // J Hematol Stem Cell Biol Transplant. 2001. Vol. 29, N 2. P. 244–255. doi: 10.1016/s0301-472x(00)00635-4
3. De Becker A., Van Hummelen P., Bakkus M., et al. Migration of culture-expanded human mesenchymal stem cells through bone marrow endothelium is regulated by matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 // Haematologica. 2007. Vol. 92, N 4. doi: 10.3324/haematol.10475
4. Cilloni D., Carlo-Stella C., Falzetti F., et al. Limited engraftment capacity of bone marrow-derived mesenchymal cells following T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation // Blood. 2000. Vol. 96, N 10. P. 3637–3643. doi: 10.1182/blood.V96.10.3637
5. Karpenko D., Kapranov N., Bigildeev A. Nestin-GFP transgene labels immunoprivileged bone marrow mesenchymal stem cells in the model of ectopic foci formation // Front Cell Dev Biol. 2022. Vol. 10. ID 993056. doi: 10.3389/fcell.2022.993056

Бикмулина П.Ю.

Биофабрикация биоэквивалентов на основе МСК с использованием 3D-биопечати и фотобиомодуляции

Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ bikmulina_p_yu@staff.sechenov.ru

Аннотация. Технология тканевой инженерии и 3D-биопечати требует новых методов для улучшения выживания и дифференцировки клеток. В данном исследовании оценивалось влияние фотобиомодуляции на сфероиды из мезенхимных стромальных клеток (МСК) в 3D-условиях. Использовали МСК из десны человека и проводили фотобиомодуляцию в красном (633 нм) и ближнем инфракрасном (840 нм) диапазонах. Результаты показали, что фотобиомодуляция стимулирует пролиферацию клеток, особенно при 840 нм, улучшая метаболическую активность и синтез АТФ. Напечатанные биоэквиваленты, подвергнутые фотобиомодуляции в ближнем инфракрасном диапазоне демонстрировали повышенную активность миграции клеток.

Ключевые слова: 3D-биопечать; сфероиды; МСК; гидрогель; фотобиомодуляция.

Bikmulina P.Y.

Biofabrication of MSC-based bioequivalents using 3D bioprinting and photobiomodulation

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. The technology of tissue engineering and 3D bioprinting requires new methods to improve cell survival and differentiation. This study evaluated the effect of photobiomodulation on mesenchymal stem cell (MSC) spheroids in a 3D environment. Human gingival MSCs were used, and photobiomodulation was applied in the red (633 nm) and near-infrared (840 nm) ranges. The results showed that photobiomodulation stimulates cell proliferation, particularly at 840 nm, enhancing metabolic activity and ATP synthesis. 3D structures with near-infrared photobiomodulation exhibited increased cell migration activity.

Keywords: 3D bioprinting; spheroid; MSC; hydrogel; photobiomodulation.

В настоящее время применение различных скаффолдов с иммобилизованными в них клетками для получения тканеинженерных продуктов и трансплантации является одним из наиболее распространенных подходов в регенеративной медицине. Кроме того, активно развивается метод 3D-биопечати за счет возможности получения объемных биоэквивалентов со сложной внутренней структурой. Этот метод позволяет смоделировать условия нативной ткани за счет трехмерных клеточных взаимодействий, присутствия внеклеточного матрикса и также позволяет получать большое количество стандартизированных биоэквивалентов, что является необходимым параметром для внедрения тканеинженерных конструкций в клиническую практику. Однако зачастую происходит гибель клеток в процессе биопечати ввиду стрессовых условий, а также внутри конструкций из-за недостатка кислорода, питательных веществ, отсутствия васкуляризации. Фотобиомодуляция является одним из многообещающих подходов ввиду неинвазивности, способности проникать в высокогидратированные структуры и показанной способности модулировать физиологию клеток в условиях стресса. Целью данного исследования была оценка влияния фотобиомодуляции на сфероиды из мезенхимальных стромальных клеток (МСК) в 3D-условиях.

Для формирования сфероидов использовали мезенхимальные стромальные клетки (МСК), полученные из альвеолярной слизистой оболочки свободной десны человека. Фотобиомодуляция в красном (633 нм) и ближнем инфракрасном (840 нм) спектрах осуществлялась с использованием немонахроматических

светодиодных излучателей (ИФТ РАН, Россия). Доза облучения в красном и ближнем инфракрасном диапазонах для обоих режимов составила 2,2 Дж/см². Биоэквиваленты формировали с использованием гидрогеля на основе модифицированного фибриногена (25 мг/мл, Sigma-Aldrich, Германия), желатина (75 мг/мл, Sigma-Aldrich, Германия), рибофлавина (0,02%, Sigma-Aldrich, Германия) и экструзионного 3D-биопринтера BioX (Cellink, Швеция). Анализ физиологии клеток включал общую оценку жизнеспособности клеток (окрашивание Live/Dead), оценку метаболической активности (тест AlamarBlue, Invitrogen, США, количественный анализ АТФ, Promega, США), определение скорости пролиферации (тест PicoGreen, Invitrogen, США), иммуноцитохимию основных маркеров МСК и внеклеточного матрикса и морфометрический анализ.

Было отмечено, что жизнеспособность клеток в составе 3D-культуры зависит от условий и отличается между сфероидами, сфероидами в гидрогеле и напечатанными сфероидами. Нормализованная метаболическая активность возрастала на 50–60% в процессе 14-дневного культивирования. При анализе воздействия ФБМ на сфероиды, культивируемые в условиях неадгезивных планшетов без гидрогеля не было выявлено значимой разницы между группами. Однако было обнаружено, что оба типа фотобиомодуляции стимулируют пролиферативную активность трехмерных напечатанных конструктов. В частности, было отмечено, что фотобиомодуляция с длиной волны 840 нм усиливает метаболическую активность (на 14-й день культивирования) и синтез АТФ (на протяжении всего срока культивирования, на 1-й, 3-й и 14-й день). Более того, напечатанные структуры, подвергнутые воздействию ФБМ в ближней инфракрасной области, демонстрировали повышенную миграционную активность клеток.

Таким образом, был продемонстрирован потенциал фотобиомодуляции для стимулирования метаболической активности и пролиферации клеток в трехмерных тканеинженерных структурах. За счет своего удобства и эффективности данный подход может найти широкое применение в тканевой инженерии, в частности для 3D-биопечати биоэквивалентов с высокой жизнеспособностью и прекондиционирования клеток в скаффолдах перед трансплантацией.

Исследование выполнено в рамках гранта Российского научного фонда №22-75-10120.

Билалова А.Р.¹ ✉, Кабдеш И.М.¹, Тутова О.Н.^{1,2}, Мухамедшина Я.О.^{1,2}, Челышев Ю.А.²

Посттравматические реакции нейронов передних рогов спинного мозга крысы в поясничном отделе, отдалённом от эпицентра травмы

¹ Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

✉ bilalovaazilya19@gmail.com

Аннотация. При травме спинного мозга развиваются молекулярные и клеточные события, приводящие к гибели нейронов. Цель работы — анализ изменений в нейрональном компоненте передних рогов поясничного утолщения спинного мозга крысы, травмированного на уровне грудного отдела в острый и хронический периоды.

Ключевые слова: травма спинного мозга; отдаленное повреждение; парвальбумин; остеопонтин.

Bilalova A.R.¹, Kabdesh I.M.¹, Tutova O.N.^{1,2}, Mukhamedshina Ya.O.^{1,2}, Chelyshev Yu.A.²

Posttraumatic reactions of rat spinal cord ventral horns neurons in the lumbar spinal cord remote from the epicenter of injury

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract. In spinal cord injury, molecular and cellular shifts that lead to neuronal death develop. The aim of the work is to analyse changes in the neuronal component of the ventral horns of the lumbar enlargement of the rat spinal cord injured at the thoracic level during acute and chronic phases.

Keywords: spinal cord injury; remote injury; parvalbumin; osteopontin.

Травма спинного мозга (ТСМ) приводит к значительным нарушениям как соматических, так и вегетативных функций, вызывая инвалидизацию и ухудшение качества жизни пострадавших. При ТСМ происходят сложные молекулярные и клеточные процессы, которые приводят к гибели нейронов и глиальных клеток. Патологические изменения могут наблюдаться не только в области непосредственного повреждения, но и в отдаленных участках спинного мозга, однако в настоящее время данные сдвиги остаются малоизученными. Выраженность этих изменений зависит от тяжести травмы и ее периода, что в свою очередь приводит к различной степени вовлеченности проводящих путей.

В данном исследовании использовали модель контузионной ТСМ крыс породы Wistar с помощью импактора (Impact One, Leica) на уровне 8-го грудного позвонка (Th8) со скоростью 4 м/с, что соответствует тяжелой степени повреждения. На 7-е и 60-е сутки после травмы область, соответствующая поясничному утолщению (L3–4), была выделена из спинного мозга и зафиксирована в 4%-ном забуференном формалине. Полученные с помощью криостата поперечные срезы спинного мозга использовали для количественного анализа остеопонтина (OPN)- и парвальбумина (PARV)- иммунопозитивных нейронов в VII, VIII и IX пластинках серого вещества.

Исследование показало, что количество PARV⁺-нейронов уменьшается в VII и IX пластинках серого вещества спинного мозга на 7-е и 60-е сутки после ТСМ в области, удаленной (L3–4) от эпицентра повреждения (Th8). Это может указывать на гибель или функциональные изменения ГАМК-эргических интернейронов, что способно влиять на баланс возбуждения и торможения в спинном мозге. Количество OPN⁺-нейронов

не претерпевает значительных изменений во всех исследуемых пластинках (VII, VIII, IX) серого вещества спинного мозга в области поясничного утолщения (L3–4) на 7-е и 60-е сутки после нанесения ТСМ на уровне Th8. Тенденция к сохранению OPN⁺-нейронов в исследуемых пластинках серого вещества может свидетельствовать о бóльшей интенсивности влияния тормозящего микроокружения.

Изучение реакции нейронального компонента в передних рогах спинного мозга, особенно в различных его пластинках, в области каудальнее эпицентра повреждения в отдаленных его участках, имеет ключевое значение для понимания механизмов посттравматических процессов и поиска новых потенциальных терапевтических мишеней для улучшения функциональных результатов после ТСМ. Понимание этих механизмов может привести к разработке новых подходов к лечению и реабилитации пациентов с ТСМ.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-25-00002, <https://rscf.ru/project/23-25-00002/>.

Биялов А.И.^{1,2} ✉, Козлова О.С.¹, Филатов Н.С.¹, Шагимарданова Е.И.^{2,3}, Киясов А.П.¹, Гусев О.А.^{1,3}

Транскриптомика единичных клеток эластического хряща ушной раковины мыши рода *Acomys*

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Московский Клинический Научный Центр им. А.С. Логинова, Москва, Россия

³ ООО «ЛИФТ», Москва, Россия

✉ bilyalovair@yandex.ru

Аннотация. Используя технологию транскриптомики единичных клеток ушной раковины *Acomys cahirinus* после ее травматизации, были выявлены уникальные экспрессии генов, связанные с ремоделированием матрикса и регуляцией окислительного стресса эластического хряща.

Ключевые слова: *Acomys*; single-cell RNA seq; эластический хрящ.

Bilyalov A.I.^{1,2}, Kozlova O.S.¹, Filatov N.S.¹, Shagimardanova E.I.^{2,3}, Kiyasov A.P.¹, Gusev O.A.^{1,3}

Transcriptomics of single cells of the elastic cartilage of the auricle mice of the genus *Acomys*

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov, Moscow, Russia

³ LLC "LIFT", Moscow, Russia

Abstract. Using the technology of single-cell transcriptomics of the auricular tissue of *Acomys cahirinus* following its trauma, unique gene expression patterns associated with matrix remodeling and oxidative stress regulation in elastic cartilage have been identified.

Keywords: *Acomys*; single-cell RNA seq; elastic cartilage.

Проблема восстановления целостности хрящевой ткани у человека является актуальной на сегодняшний день. Деградация матрикса хряща проявляется при таких заболеваниях, как остеоартроз и ревматоидный артрит, а также при обычном механическом повреждении. Все это ведет в потере биомеханических свойств хряща и к снижению качества жизни пациента. Некоторые представители животного мира способны запускать процессы репаративного хондрогенеза. Так, скелет хрящевых рыб, состоящий из гиалинового хряща, покрытого гидроксиапатитом фосфата кальция, может расти в течение всей жизни особи [1]. Представитель класса земноводных, Мексиканский Аксолотль, обладает способностью полностью восстанавливать утраченную конечность, в том числе и суставные хрящи [2]. Среди млекопитающих также можно найти «экстремальные» примеры животных, способных запускать процессы репаративного хондрогенеза. Так, в одной из наших работ мы на морфологическом уровне описали возможности репаративного хондрогенеза эластического хряща мышей рода *Acomys* после его травматизации [3]. Целью данного исследования является использование технологии транскриптомики единичных клеток для поиска молекулярно-генетических механизмов репарации, запускаемых в тканях ушной раковины мышей *Acomys cahirinus* после ее травматизации. В рамках данной работы проводится сравнение экспрессии РНК в разных группах клеток между образцами поврежденной ткани ушной раковины *Acomys cahirinus* и мыши линии Balb/c — лабораторной мыши, которая, будучи наиболее близким к *Acomys cahirinus* модельным организмом, используется в качестве контроля. Сбор клеток осуществлялся в разные периоды после повреждения ушных раковин: нативная ушная раковины, спустя шесть часов, два дня и пять дней после нанесения травм. Библиотеки для секвенирования были подготовлены с использованием протокола 10X Genomics Single

Cell 5' R2-only. Было произведено картирование прочтений на геном *Acomys cahirinus* и *Mus musculus* в программе cellranger count. Дальнейшая обработка данных осуществлялась с использованием пакетов R Seurat и conpos. Аннотация клеточных популяций проводилась вручную при помощи маркерных генов, характерных для каждого клеточного типа. В группе мышей *Acomys cahirinus* в клетках хрящевой ткани (хондрокластах) наблюдалась повышенная экспрессия генов матричных металлопротеиназ (ММР3 и ММР10), которые активно участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса путем разрушения компонентов экстрацеллюлярного матрикса, клеточных поверхностных белков и базальных мембран, также они способны к стимулированию клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки и ангиогенеза. В группе мышей Balb/c данное явление отсутствовало. В то же время в хондробластах мы наблюдали повышенную экспрессию генов, кодирующих различные типы коллагенов (Col9a3, Col2a1 и Col3a1) в группе *Acomys cahirinus*, что свидетельствует о начавшемся синтезе компонентов внеклеточного матрикса эластического хряща. Следующей важной находкой стала гиперэкспрессия генов металлотионеинов 1-го и 2-го типа (Mt1, Mt2). Необходимо отметить, что данная экспрессия в группе мышей *Acomys cahirinus* наблюдалась во всех клеточных типах ушной раковины, что может свидетельствовать об универсальном клеточном ответе на повреждение. Основной функцией данных белков является регуляция метаболизма цинка в организме, а также они способны контролировать механизмы окислительного стресса, связывая и нейтрализуя свободные радикалы, которые активно накапливаются при повреждении тканей. Также некоторые гены белков теплового шока, такие как HSPB1, имели повышенную экспрессию в некоторых клеточных кластерах (эндотелий и дифференцированные кератиноциты) в группе мышей *Acomys cahirinus*. В таких же кластерах группы мышей Balb/c экспрессия этих генов оценивалась сравнительно ниже как в нативном образце, так и на экспериментальных точках. Ответ на травматизацию в кластерах иммунных клеток также отличался: так, у *Acomys cahirinus* на 6-й час после травматизации ушной раковины дифференциально экспрессированными по сравнению с контрольной точкой были признаны лишь 6 генов, в то же время у мышей Balb/c — 160, что говорит о более раннем иммунном ответе на повреждение у контрольной группы животных. Таким образом, при помощи технологии секвенирования единичных клеток можно выявить уникальные молекулярно-генетические маркеры и процессы, происходящие у немодельных животных в эксперименте по травматизации ушной раковины.

Список литературы

1. Marconi A., Hancock-Ronemus A., Gillis J.A. Adult chondrogenesis and spontaneous cartilage repair in the skate, *Leucoraja erinacea* // eLife. 2020. Vol. 12, N 9. ID e53414. doi: 10.7554/eLife.53414
2. McCusker C., Bryant S.V., Gardiner D.M. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods // Regeneration (Oxf). 2015. Vol. 2, N 2. P. 54–71. doi: 10.1002/reg2.32
3. Билялов А.И., Филимошина Д.Д., Филатов Н.С., и др. У мышей рода *Acomys* после травмы восстанавливается эластический хрящ ушной раковины // Гены и Клетки. 2022. Т. 17, № 1. С. 42–47. EDN: EKHSUG doi: 10.23868/202205003

Бирюкова В.Н.✉, Басалова Н.А., Виговский М.А., Григорьева О.А., Монакова А.О.,
Макаревич П.И., Ефименко А.Ю.

Подбор среды роста для сохранения свойств МСК в условиях длительного культивирования и производства биологических препаратов на основе их секретомы

Медицинский научно-образовательный институт МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ vbiryukova2000@gmail.com

Аннотация. Правильно подобранная культуральная среда должна обеспечить сохранение свойств МСК и эффективность продуктов на их основе при длительном культивировании клеток. Мы протестировали несколько коммерческих сред по влиянию на пролиферацию МСК и секретомы этих клеток до и после криоконсервации.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные/стволовые клетки; МСК; криоконсервация; секретомы; среда культивирования; бесклеточная терапия.

Biryukova V.N., Basalova N.A., Vigovskii M.A., Grigorieva O.A., Monakova A.O.,
Makarevich P.I., Efimenko A.Yu.

Selection of growth media for maintaining MSCs properties during long-term culture and secretome-based product fabrication

Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Appropriate culture medium is crucial for maintaining MSCs properties and MSCs-based product efficacy during long-term cell culture. We investigated the effects of several commercially available media on MSCs proliferation and secretome both before and after cryopreservation.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells; MSCs; cryopreservation; secretome; culture medium; cell-free therapy.

Мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) широко используются при разработке различных подходов регенеративной медицины, в том числе бесклеточной терапии, так как многие регенераторные эффекты МСК, включая проангиогенное, антиапоптотическое и иммуномодулирующее действие, обусловлены высвобождением большого количества секретируемых факторов в составе секретомы этих клеток [1, 2]. Одной из стандартных операций в исследовательской и клинической практике является криоконсервация МСК, способная обеспечить долгосрочную доступность клеточного материала для манипуляций. Существуют противоречивые данные касательно того, сохраняют ли криоконсервированные МСК функциональные свойства на таком же уровне, как выделенные из ткани, что поднимает вопрос о контроле эффективности конечного продукта [3]. Одним из важных аспектов в решении этой проблемы является подбор среды культивирования, используемой до и после криоконсервации МСК, которая позволит получать секретомы стабильного и воспроизводимого состава. В связи с этим целью нашей работы было оценить степень сохранения пролиферативных свойств МСК, а также характеристик секретомы в тестируемых средах роста до и после криоконсервации.

МСК выделяли из жировой ткани условно здоровых пациентов до 65 лет и культивировали в 2 классических средах роста DMEM и MEM Alpha (Gibco) с добавлением фетальной бычьей сыворотки и 2 средах, специализированных для культивирования МСК — HiMesoXL (HIMEDIA) с добавлением фетальной бычьей сыворотки и Advance STEM (HyClone) с заменителем сыворотки. После проводили оценку ключевых

параметров: соответствия выделенных клеток характеристикам МСК [4], пролиферативных свойств клеток с помощью системы прижизненного клеточного анализа (BioSra) и характеристик секретома: концентрации ключевых регенераторных растворимых факторов (VEGF, HGF, IGF, Ang-1) методом иммуноферментного анализа (ИФА) и количество и размер частиц, соответствующих внеклеточным везикулам, методом анализа траектории наночастиц (NTA). Для того, чтобы выяснить, в какой среде культивирования лучше сохраняются свойства МСК после криоконсервации, замораживали ранее выделенные из жировой ткани МСК и размораживали через 2–3 месяца, выводя в культуру в соответствующие тестируемые среды роста. Проводили повторную оценку пролиферативной активности МСК и характеристик секретома.

Нами было показано, что при использовании всех протестированных сред роста из жировой ткани человека успешно выделяются клетки, соответствующие критериям МСК, при культивировании в среде Advance STEM наблюдается наибольшее соответствие заявленным критериям. Наибольшей пролиферативной активностью до криоконсервации обладают МСК, культивируемые в среде aMEM. Наиболее высокое содержание секреторируемых факторов достигается при культивировании клеток в средах Advance STEM (HGF, IGF, Ang-1) и HiMesoXL (VEGF), частиц, соответствующих по размеру внеклеточным везикулам — в Advance STEM. После криоконсервации во всех тестируемых средах сохраняются жизнеспособные клетки, наибольшая доля — в средах Advance STEM и HiMesoXL. Лучше всего сохраняется морфология и пролиферативная активность МСК после криоконсервации при культивировании в средах Advance STEM и aMEM. Интересно, что при длительном культивировании МСК в средах DMEM и HiMesoXL клетки не способны к активной пролиферации, что может быть связано с ускоренной сенесценцией клеток в данных средах. Наиболее высокое содержание в секретома МСК после криоконсервации исследованных секреторируемых факторов и внеклеточных везикул достигается при культивировании в среде Advance STEM.

Таким образом, свойства МСК лучше всего сохраняются после длительного культивирования и криоконсервации в среде Advance STEM, специализированной для роста МСК. При культивировании в этой среде возможно получить секретом с наиболее высоким содержанием регенераторных факторов и внеклеточных везикул. Тем не менее, для быстрого и экономически более выгодного наращивания большого количества МСК возможно использование среды роста aMEM, способной обеспечить оптимальные условия для сохранения пролиферативных свойств клеток до и после криоконсервации. Исследование выполнено при поддержке Государственного задания МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Список литературы

1. Vizoso F., Eiro N., Cid S., et al. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine // *Int J Mol Sci.* 2017. Vol. 18, N 9. ID 1852. doi: 10.3390/ijms18091852
2. Sagaradze G., Grigorieva O., Nimiritsky P., et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: towards the clinical translation // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20, N 7. ID 1656. doi: 10.3390/ijms20071656
3. Galipeau J. Concerns arising from MSC retrieval from cryostorage and effect on immune suppressive function and pharmaceutical usage in clinical trials // *ISBT Sci Ser.* 2013. Vol. 8, N 1. P. 100–101. doi: 10.1111/voxs.12022
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. Vol. 8, N 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

Богданова Д.Н.^{1,2}, Чабина А.С.¹, Нащекин А.В.³, Нащекина Ю.А.¹

Влияние полиэтиленгликоля в составе пленок на основе поликапролактона на адгезию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток

¹ ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия

² СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

³ ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ st102611@student.spbu.ru

Аннотация. Созданы композитные пленки на основе поликапролактона, модифицированного полиэтиленгликолем для повышения гидрофильности поверхности. Охарактеризованы морфология, поверхностные свойства и биосовместимость пленок в зависимости от молекулярной массы полиэтиленгликоля.

Ключевые слова: тканевая инженерия; поликапролактон; полиэтиленгликоль; композитные пленки; мезенхимальные стромальные клетки.

Bogdanova D.N.^{1,2}, Chabina A.S.¹, Nashchekin A.V.³, Nashchekina Yu.A.¹

The effect of polyethylene glycol in polycaprolactone-based films on the adhesion and proliferation of mesenchymal stromal cells

¹ INC RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ A.F. Ioffe Institute of Physics of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Composite films based on polycaprolactone modified with polyethylene glycol to increase the surface hydrophilicity have been created. The morphology, surface properties and biocompatibility of the films have been characterized depending on the molecular weight of polyethylene glycol.

Keywords: tissue engineering; polycaprolactone; polyethylene glycol; composite films; mesenchymal stromal cells.

Широкому применению синтетических полимеров в современной тканевой инженерии способствуют их подходящие физико-химические свойства. В частности, поли-ε-капролактон (ПКЛ) образует эластичные и при этом прочные нити, волокна и пленки за счет больших линейно-разветвленных молекул [1]. Значительные недостатки полимера, а именно: гидрофобность, отсутствие поверхностного заряда и сайтов связывания, — усложняют адгезию и пролиферацию клеток. Поэтому для применения ПКЛ в регенеративной медицине необходимо повышение его биосовместимости, которое возможно за счет проведения различных модификаций, например введения гидроксильных или аминогрупп в составе других полимеров.

Простым и доступным методом является модификация ПКЛ путем его физического смешивания с полиэтиленгликолем (ПЭГ) — источником гидроксильных групп, повышающих гидрофильность поверхности готовых пленок [2]. А целью работы стало получение пленок на основе смеси ПКЛ и ПЭГ, определение их свойств и изучение взаимодействия мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с ними.

Для выявления наиболее эффективной модификации был использован ПЭГ различной молекулярной массы, а именно 1, 2, 4, 6, 8 и 15 кДа, так как она существенно влияет на свойства полимера, а значит, и на свойства поверхности пленок.

Из смеси 70% ПКЛ, 30% ПЭГ и хлороформа формировали композитные пленки методом полива из раствора, варьируя объем его нанесения. После полного испарения растворителя пленки инкубировали в воде

в течение суток для частичного вымывания фазы ПЭГ, в результате чего на поверхности образовывались лунки с остаточным ПЭГ, придавая пленкам более развитую топологию.

Количество растворенного в воде ПЭГ измеряли спектрофотометрическим методом, по результатам которого было отмечено, что минимум вышедшего ПЭГ — при его молекулярной массе 15 кДа, максимум — при 1 и 4 кДа. Благодаря измерению краевого угла смачивания установили, что пленки с наиболее гидрофильной поверхностью формируются при использовании ПЭГ молекулярной массы 6 кДа.

Анализ структуры поверхности пленок проводили с помощью поляризационной и сканирующей электронной микроскопии, а также программы ImageJ. Было выявлено, что количество, размеры, форма и расположение пор зависят от молекулярной массы ПЭГ и объема нанесения раствора при изготовлении пленок. Было обнаружено, что пленки с ПЭГ массой 6, 8, 15 кДа имеют большие по размеру поры, чем с массой 1, 2 и 4 кДа, а пленки с ПЭГ массой 2, 4 и 8 кДа — большие сферолиты.

Для оценки механических характеристик пленок использовали разрывную машину Shimadzu AGS-100kNXD. По результатам исследования было отмечено, что пленки без инкубации обладали большей прочностью по сравнению с другими, выдержанными в воде.

Адгезию и пролиферацию МСК изучали с помощью окрашивания генцианвиолетом через 1 и 3 суток культивирования. Пленки с ПЭГ 6 и 8 кДа продемонстрировали лучшую биосовместимость. Также считали количество адгезировавших к пленкам МСК после 2 часов и суток культивирования по окрашенным DAPI ядрам в программе ImageJ. Больше количество клеток было обнаружено на образцах с ПЭГ массой 1 кДа, однако на данных пленках образуются клеточные конгломераты.

Таким образом, пленки из ПКЛ в сочетании с ПЭГ демонстрируют улучшенные показатели биосовместимости в сравнении с немодифицированными пленками.

Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (грант №21-74-20120).

Список литературы

1. Антонова Л.В., Насонова М.В., Кудрявцева Ю.А., Головкин А.С. Возможности использования полиоксикапролатов и поликапролактона в качестве сополимерной основы для создания тканеинженерных конструкций в сердечно-сосудистой хирургии // Бюллетень сибирской медицины. 2012. Т. 11, № 1. С. 128–134. EDN: OXLHVN doi: 10.20538/1682-0363-2012-1-128-134
2. Mondal D., Griffith M., Venkatraman S.S. Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges // Int J Polym Mater Polym Biomater. 2016. Vol. 65, N 5. P. 255–265. doi: 10.1080/00914037.2015.1103241

Богомазова А.Н.^{1,2} ✉, Секретова Е.К.¹, Федоренко А.В.¹, Хомякова Е.А.^{1,2}, Сурдина А.В.^{1,2}, Лиманская Т.В.¹, Лебедев И.Н.², Лагарькова М.А.¹

Нарушение сигнального пути Rho-ROCK и миграции нейронов в ИПСК-модели X-сцепленной умственной отсталости по типу Насименто

¹ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М.Лопухина, Москва, Россия

² Томский национальный исследовательский медицинский центр, Томск, Россия

✉ abogomazova@rcrcm.org

Аннотация. X-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто обусловлена утратой функции гена *UBE2A*. Нейрональные предшественники, дифференцированные из ИПСК с нокаутом гена *UBE2A*, демонстрируют дефект в сигнальном пути Rho-ROCK и нарушенную миграцию.

Ключевые слова: X-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто; моделирование на основе ИПСК; нейрональные предшественники; сигнальный путь Rho-ROCK; миграция клеток.

Bogomazova A.N.^{1,2}, Sekretova E.K.¹, Fedorenko A.V.¹, Khomyakova E.A.¹, Surdina A.V.¹, Limanskaya T.V.¹, Lebedev I.N.², Lagarkova M.A.¹

Impaired Rho-ROCK signaling and neuronal migration in a human iPSC-based model of X-linked intellectual disability type Nascimento

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. X-linked intellectual disability type Nascimento is caused by loss-of-function mutations in the *UBE2A* gene. Neuronal progenitors differentiated from iPSCs with a knockout of the *UBE2A* gene exhibit a defect in the Rho-ROCK signaling pathway and impaired migration.

Keywords: X-linked intellectual disability type Nascimento; iPSC-based disease modelling; neuronal progenitors; Rho-ROCK signaling; cell migration.

X-сцепленная умственная отсталость по типу Насименто, или синдром Насименто — это редкая форма задержки умственного развития, впервые описанная в 2006 году и связанная с потерей функции или делециями гена *UBE2A* [1]. Есть сведения, что не только делеции, но и дупликации участка X-хромосомы, содержащего ген *UBE2A*, приводят к умственной отсталости. В настоящее время неизвестно, какую роль играет ген *UBE2A* в развитии центральной нервной системы, однако существуют данные о его участии в митохондриях, регуляции транскрипции, репарации ДНК. Ранее в нашей лаборатории были созданы изогенные линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), отличающиеся по дозе гена *UBE2A*: нормальные ИПСК, ИПСК с нокаутом и гиперэкспрессией гена *UBE2A*. Данная изогенная система ИПСК была дополнена ИПСК пациента с синдромом Насименто [2, 3], и полученная модельная клеточная система использована нами для изучения роли гена *UBE2A* в нейрогенезе.

В нашей работе 4 линии ИПСК модельной системы были дифференцированы в клетки нейрональных предшественников (НП) (PAX6+, Nestin+) и в нейросферы и глию. Для полученных НП был проведен транскриптомный анализ, нейросферы были использованы для оценки скорости миграции НП.

В транскриптомном анализе у НП было выявлено более 1200 дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) с повышенной экспрессией и более 1400 ДЭГ с пониженной экспрессией. При функциональном

анализе генов с пониженной экспрессией в НП, полученных из ИПСК пациента, были выявлены нарушения экспрессии генов, связанных с онтологиями регуляции цитоскелета, развития аксонов и дендритов, а также регуляции синапсов. Анализ обогащения биохимических путей выявил один общий для этих онтологий сигнальный путь Rho/ROCK, нарушение которого, как известно, приводит к задержке нейронального развития. Сходные изменения профиля экспрессии генов в НП мы наблюдали также при нокауте гена *UBE2A*, и, что удивительно, при его гиперэкспрессии. Для функциональной верификации транскриптомных данных мы оценили скорость миграции НП из нейросфер, полученных из ИПСК и культивируемых в прикрепленном состоянии в течение 3 суток. Мы выявили сниженную скорость миграции НП с нокаутом и гиперэкспрессией гена *UBE2A*, что подтверждает данные транскриптома.

Таким образом, мы впервые показали, что аномалии дозы гена *UBE2A* ведут к снижению экспрессии генов Rho/ROCK сигнального пути в НП и к снижению клеточной подвижности.

Работа выполнена при финансировании РФФИ, грант № 21-65-00017.

Список литературы

1. Nascimento R.M., Otto P.A., de Brouwer A.P., Vianna-Morgante A.M. *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome // *Am J Hum Genet.* 2006. Vol. 79, N 3. P. 549–555. doi: 10.1086/507047
2. Tolmacheva E.N., Kashevarova A.A., Nazarenko L.P., et al. Delineation of clinical manifestations of the inherited Xq24 microdeletion segregating with sXCI in mothers: two novel cases with distinct phenotypes ranging from *UBE2A* deficiency syndrome to recurrent pregnancy loss // *Cytogenet Genome Res.* 2020. Vol. 160, N 5. P. 245–254. doi: 10.1159/000508050
3. Федоренко А.В., Хомякова Е.А., Сурдина А.В., и др. Создание клеточной модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток для изучения функций гена *UBE2A* // *Гены и Клетки.* 2024. Т. 19, № 2. С. 297–313. EDN: NADXLH doi: 10.17816/gc623799

Богомолова А.Ю.¹ ✉, Ермакова П.С.¹, Васильчикова Е.А.^{1,2}, Целоусова Ю.М.¹,
Загайнова Е.В.^{1,3}, Кашина А.В.¹

***In vitro* и *in vivo* оценка биобезопасности децеллюляризированных матриц, используемых для создания микроокружения инсулин-продуцирующих клеток**

¹ ФГБОУ ВО “Приволжский исследовательский медицинский университет”, Нижний Новгород, Россия

² ФГАУ ВО “Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского”, Нижний Новгород, Россия

³ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина, Москва, Россия

✉ baleksandra@icloud.com

Аннотация. Использование тканеинженерных подходов на основе децеллюляризированных (ДЦЛ) матриц для повышения эффективности трансплантации островков Лангерганса (ОЛ) представляет огромный интерес в поиске альтернативного метода лечения СД 1-го типа. *In vitro* анализ подтвердил отсутствие цитотоксичности ДЦЛ матриц и сохранение жизнеспособности ОЛ. При *in vivo* анализе наблюдалась незначительная воспалительная реакция, что говорит о необходимости дальнейшей минимизации иммуногенности полученных матриц.

Ключевые слова: островок Лангерганса; децеллюляризация; тканеинженерный конструкт; иммуногенность; трансплантация; диабет.

Bogomolova A.Yu.¹, Ermakova P.S.¹, Vasilchikova E.A.^{1,2}, Tselousova J.M.¹, Zagainova E.V.^{1,3}, Kashina A.V.¹

***In vitro* and *in vivo* assessment of the biosafety of decellularized matrices used to create the microenvironment of insulin-producing cells**

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² National Research Nizhny Novgorod State University Named after N. I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

³ Lopukhin federal research and clinical center of physical-chemical medicine, Moscow, Russia

Abstract. The use of tissue engineering approaches based on decellularized matrices to improve the efficiency of islets of Langerhans (IL) transplantation is of great interest in the search for an alternative method of treating type 1 diabetes. *In vitro* analysis confirmed the absence of cytotoxicity of DCL matrices and the preservation of IL viability. *In vivo* analysis, a slight inflammatory reaction was observed, which indicates the need to further minimize the immunogenicity of the resulting matrices.

Keywords: islet of Langerhans; decellularization; tissue-engineered construct; immunogenicity; transplantation; diabetes.

Наиболее эффективным методом лечения сахарного диабета 1-го типа по-прежнему является аллотрансплантация островков поджелудочной железы, которая при сочетании благоприятных условий (достаточное количество выделенных островков, удачная комбинация иммуносупрессивных препаратов) способствует достижению инсулиннезависимости реципиентов на протяжении нескольких лет. Однако постоянный дефицит донорских поджелудочных желез и ограниченность выживания островков в организме реципиента не позволяют увеличить количество таких трансплантаций и повысить их эффективность. Именно поэтому трансплантация островков Лангерганса (ОЛ) — альтернативный вариант лечения инсулин-дефицитных состояний. Важной проблемой остается непродолжительность выживания и функциональной активности

островков из-за деструкции внеклеточного матрикса (ВКМ) при выделении клеток и нарушение васкуляризации и оксигенации при их трансплантации. Актуальным является использование тканеинженерных подходов для повышения эффективности трансплантации ОЛ. В настоящее время активно используются тканеинженерные конструкции (ТИК) различных тканей и органов как на основе созданных материалов — носителей (искусственных и природных), так и полученных из нативных органов. Наибольшим преимуществом обладают ТИК на основе децеллюляризованных (ДЦЛ) матриксов, поскольку именно эти матриксы обладают необходимой архитектурой и сохранностью нативных белков ВКМ. На сегодняшний день не создано эффективного ТИК поджелудочной железы (ПЖ) на основе инсулин-продуцирующих клеток и ДЦЛ матрикса. Кроме того, из-за нехватки донорских органов поджелудочной железы остается актуальным не только поиск альтернативных органов для получения дВКМ, но и источника органов, в частности ксеногенного материала. Целью нашей работы являлось получение ДЦЛ матриксов органов свиньи, оптимизация наиболее удачной методики децеллюляризации и оценка их биобезопасности *in vitro* и *in vivo*. В качестве объектов исследования использованы следующие органы: легкие и ПЖ свиньи породы Визинау. Было апробировано несколько протоколов децеллюляризации для каждого из органов. Параллельно несколько фрагментов легкого, размером не более 1×1 см, последовательно выдерживались в 0,5% растворе Triton X-100 — 1 час, 0,5% растворе SDS (додецилсульфат натрия) — 1 час, 1% растворе SDC (дезоксихолат натрия) — 1 час и 0,075% растворе SDS — 41 час, оставшиеся фрагменты легкого, размером не более 1×1 см, находились в перенасыщенном солевом растворе, содержащем 1,19M KCl, 1,74M NaCl, 0,86M CaCl₂, в течение 96 часов. В случае поджелудочной железы использовались следующие протоколы: несколько фрагментов поджелудочной железы, размером не более 0,5×0,5 см, последовательно выдерживались в 0,1% растворе SDS в dH₂O — 1 час, 0,1% растворе SDS в 1N NaCl dH₂O — 1 час, 0,1% растворе SDS в PBS — 18 часов, оставшиеся фрагменты поджелудочной железы, размером не более 0,5×0,5 см, находились в перенасыщенном солевом растворе, содержащем 1,19 M KCl, 1,74 M NaCl, 0,86 M CaCl₂, в течение 96 часов. Структуру матрикса и качество удаления клеточного компонента оценивали гистологическим методом. Для *in vitro* исследования анализировали остаточную ДНК в ДЦЛ матриксах с использованием набора реагентов ExtractDNA Blood & Cells на спектрофотометре NanoDrop ND-2000. Был поставлен и отработан протокол получения жизнеспособных и функционально активных островков Лангерганса от крыс породы Wistar. Цитотоксичность оценивали на матриксах, с минимизированной остаточной клеточной компонентой. Тест на жизнеспособность ОЛ проводился при помощи окрашивания live/dead на 3 и 7 сутки инкубации, как без матрикса, так и на ДЦЛ матриксе легкого и ПЖ. Для *in vivo* исследования полученные слайсы ДЦЛ матриксов трансплантировались в брюшину и сальник крыс породы Wistar, для оценки биобезопасности и биодеградации. Через неделю, 4 недели и 8 недель проводился забор части брюшины и сальника с трансплантируемым матриксом. Степень фиброзирования и реакцию на воспаление от трансплантированного матрикса оценивали путем приготовления гистологических препаратов по методике окрашивания гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону. Получены бесклеточные органые матриксы органов свиньи. Установлено, что для проведения ДЦЛ легкого подходит методика с использованием SDS и SDC, а для ПЖ — с использованием SDS. Как в случае легкого, так и в случае ПЖ, показано высокое сохранение коллагеновых и эластиновых волокон, не наблюдаются клетки или остаточные ядра. Концентрация ДНК статистически значимо снижается до 8% в дВКМ легкого и до 6% в дВКМ ПЖ по отношению к контрольным образцам, соответственно. На 7-й день инкубации процент жизнеспособных ОЛ статистически значимо увеличивается при инкубации на ДЦЛ матриксах по сравнению с ОЛ, находящимися в питательной среде (с 60% для ОЛ в питательной среде до 95% на дВКМ легкого и до 83% на дВКМ ПЖ). Также установлено, что при трансплантации ксеногенного материала крысам Wistar на 1-ю неделю воспалительная реакция в брюшине наиболее выражена, значительных отличий между воспалительной реакцией на трансплантаты ДЦЛ легкого и ПЖ не обнаружено, на 4-ю неделю наблюдается фиброзирование вокруг трансплантатов, наиболее выраженное в брюшине, с характерным воспалительным инфильтратом. Спустя 8 недель наблюдается меньшая воспалительная реакция вокруг материала ксенотрансплантата в брюшине, однако степень фиброзирования возрастает. В случае сальника спустя 8 недель наблюдается появление незначительного лимфоцитарного и лейкоцитарного инфильтрата с фиброзом. В результате полученных

данных *in vitro* следует говорить о том, что полученные ДЦЛ матриксы не оказывают цитотоксического эффекта на ОЛ клетки, кроме того, доказано что легкое может быть использовано в качестве альтернативного органа для получения ДЦЛ матрикса. Опираясь на данные *in vivo*, доказано, что в сальнике наименее выраженная воспалительная реакция и степень фиброзирования на ксенотрансплантат ДЦЛ легкого и ПЖ. В дальнейшем полученные ДЦЛ матриксы легкого и ПЖ могут быть использованы в качестве конструкта при формировании микроокружения инсулин-продуцирующих клеток для создания ТИК поджелудочной железы. Однако все же необходимы дальнейшие исследования для минимизации иммуногенности, а именно модификации протоколов ДЦЛ.

Работа выполнена в рамках государственного задания Минздрава РФ «Технология компенсации инсулинодефицита аутологичными островками Лангерганса у больных с новообразованиями поджелудочной железы после радикального хирургического лечения».

Богомякова М.Е.¹ ✉, Секретова Е.К.¹, Ануфриева К.С.¹, Казакова А.Н.¹, Григорьева Т.Н.², Богомазова А.Н.¹, Лагарькова М.А.¹

«Огонь по своим»: незрелость клеток как возможная причина нарушения толерантности иммунной системы в отношении аутологичных производных ИПСК

¹ ФНКЦ физико-химической медицины имени Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² Казанский федеральный университет, Казань, Россия

✉ margbog@rcpcm.ru

Аннотация. Повышенный уровень экспрессии маркеров, характерных для недифференцированных клеток, в фибробластоподобных производных ИПСК может являться свидетельством их незрелого фенотипа и быть причиной иммунного ответа со стороны НК-клеток аутологичного происхождения.

Ключевые слова: аутологичные ИПСК; дифференцировка; НК-клетки; HLA-I; бета-2-микροглобулин; иммуногенность; иммунотолерантность.

Bogomiakova M.E.¹, Sekretova E.K.¹, Anufrieva K.S.¹, Kazakova A.N.¹, Grigoryeva T.V.², Bogomazova A.N.¹, Lagarkova M.A.¹

"Friendly fire": immaturity of cells as a possible cause of impaired tolerance of the immune system towards autologous iPSC-derivatives

¹ Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Moscow, Russia

² Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. An increased level of expression of markers typical for undifferentiated cells in fibroblast-like iPSC-derivatives may indicate their immature phenotype and may trigger an immune response from autologous NK cells.

Keywords: autologous iPSCs; differentiations; NK cells; HLA-I; beta-2-microglobulin; immunogenicity; immunotolerance.

Технология репрограммирования открывает новые возможности для развития персонализированной медицины. Несмотря на различного рода ограничения, в том числе экономического характера, главным преимуществом пациент-специфических ИПСК считается толерантность иммунной системы в отношении их дифференцированных производных. Это означает, что при их трансплантации не должны возникать проблемы, связанные с гистосовместимостью пересаженных тканей и органов. Однако некоторые группы исследователей сообщают, что иммунный ответ против дифференцированных производных аутологичных ИПСК все-таки возможен [1, 2], что ставит под сомнение применение таких клеток вне протоколов иммуносупрессивной терапии.

До сих пор нет четкого понимания, что является ключевым фактором иммуногенности производных ИПСК аутологичного происхождения. Т- и НК-клетки являются основными участниками трансплантационного иммунитета, выполняющими эффекторные функции. В целом, ответ со стороны Т-клеток может быть объяснен формированием неоантигенов и aberrантной экспрессией генов [1, 3]. НК-клетки имеют другой принцип иммунологического распознавания: их активация определяется взаимодействием сигналов, поступающих от двух типов рецепторов на их поверхности: активирующих и ингибирующих. В своей недавней работе мы показали, что ответ со стороны НК-клеток на дифференцированные производные ИПСК

объясняется нарушением баланса этих сигналов в клетках-мишенях [2]. Используя изогенную клеточную модель, состоящую из исходных фибробластов и фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro), мы обнаружили, что в iPS-fibro повышена экспрессия лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D и снижена экспрессия молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов NK-клеточных рецепторов. Выявленные нарушения могут объяснить, почему мы наблюдали в 3 раза больший ответ аутологичных NK-клеток на iPS-fibro по сравнению с изогенными фибробластами кожи.

Используя общедоступные наборы данных РНК-секвенирования, мы сравнили экспрессию ключевых маркеров фибробластов и ИПСК в фибробластах кожи, iPS-fibro и недифференцированных ИПСК. В целом транскрипционный профиль iPS-fibro схож с первичными фибробластами кожи человека, однако в них сохраняется повышенный уровень экспрессии ключевых маркеров недифференцированных клеток, что может являться свидетельством их недостаточной зрелости. Также отмечалась высокая степень корреляции генной экспрессии iPS-fibro с независимо дифференцированными клетками. Экспрессия некоторых генов, кодирующих лиганды NK-клеточных рецепторов, в частности *NECTIN2*, *PVR*, *CADM1* и *CD70*, была также повышена в независимо полученных фибробластоподобных клетках. Мы полагаем, что несовершенное микроокружение во время дифференцировки *in vitro* может влиять на правильный баланс NK-клеточных лигандов в данном типе производных ИПСК.

Низкий уровень экспрессии HLA-I является характерным признаком недифференцированных клеток и может быть еще одним аргументом в пользу недостаточной зрелости iPS-fibro. Мы показали, что экспрессия молекул HLA-ABC значительно увеличивается в процессе культивирования и пассирования. Тем не менее снижение NK-клеточного ответа требует более мощных стимулов, например предварительной обработки клеток IFN γ .

Список литературы

1. Zhao T., Zhang Z.-N., Westenskow P.D., et al. Humanized Mice Reveal Differential Immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells // *Cell Stem Cell*. 2015. Vol. 17, N 3. P. 353–359. doi: 10.1016/j.stem.2015.07.021
2. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., et al. iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors // *Stem Cell Res Ther*. 2023. Vol. 14, N 1. ID 77. Published 2023 Apr 11. doi: 10.1186/s13287-023-03308-5
3. Deuse T., Hu X., Agbor-Enoh S., et al. De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans // *Nat Biotechnol*. 2019. Vol. 37, N 10. P. 1137–1144. doi: 10.1038/s41587-019-0227-7

Божокин М.С.^{1,2} ✉, Корнева Ю.С.^{1,3}, Божкова С.А.¹, Сопова Ю.В.⁴, Нащекина Ю.А.², Хотин М.Г.²

Использование аллогенных фибробластов для тканевой инженерии гиалинового хряща в эксперименте

¹ НМИЦ ТО им Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Центр Трансгенеза и редактирования генома ИТБМ СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

✉ writeback@mail.ru

Аннотация. В работе показана эффективность применения опытной клеточно-инженерной конструкции, состоящей из скаффолда на основе полилактида и фибробластов человека, для восстановления смоделированного повреждения гиалинового хряща у кроликов через 90 суток наблюдения.

Ключевые слова: гиалиновый хрящ; клеточно-инженерная конструкция; хондрогенез; фибробласты; полилактид; регенерация.

Bozhokin M.S.^{1,2}, Korneva Yu.S.^{1,3}, Bozhkova S.A.¹, Sopova Yu.V.⁴, Nashekina Yu.A.², Khotin M.G.²

Using allogeneic fibroblasts for tissue engineering of hyaline cartilage in an experiment

¹ Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R.R. Vreden. Saint Petersburg, Russia

² Institute of cytology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁴ Center of transgenesis and genome editing, Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The work shows the effectiveness of the use of an experimental cell-engineered construct consisting of a scaffold based on polylactide and human fibroblasts for the restoration of simulated damage to hyaline cartilage in rabbits after 90 days of observation.

Keywords: hyaline cartilage; cell-engineered construction; chondrogenesis; fibroblasts; polylactide; regeneration.

Повреждения гиалинового хряща (ГХ) являются актуальной проблемой современной медицины ввиду невозможности его регенерации. В настоящее время отсутствуют эффективные терапевтические методы лечения заболеваний, связанных с дегенерацией ГХ, поэтому эндопротезирование суставов является на поздних стадиях единственным методом лечения, сопряженным с риском развития серьезных осложнений и значительными экономическими затратами [1]. Тканевая инженерия является перспективным методом для замещения повреждённого ГХ за счет имплантации клеточно-инженерных конструкций (КИК) на основе биodeградируемого скаффолда и культуры клеток в область дефекта [2].

Цель настоящей работы: оценить возможность использования и регенеративный потенциал КИК из скаффолдов на основе полимолочной кислоты (PLLA) и культуры аллогенных дермальных фибробластов человека для восстановления ГХ в экспериментах на кроликах.

PLLA-скаффолды были приготовлены с использованием метода сублимационной сушки. PLLA (Sigma-Aldrich, США) растворяли в диоксане (Sigma-Aldrich, США) для образования растворов с концентрацией полимера 20 мг/мл. Дермальные фибробласты человека линии DF2 были получены из ЦКП «Коллекция культур позвоночных» (ИНЦ РАН). Клетки культивировали на среде DMEM (Gibco, США) с 10% FBS (Gibco, США) и пеницилин-стрептомицином. КИК получали с помощью оригинального разработанного биореактора

и методики динамического заселения скаффолда. Отсутствие цитотоксичности скаффолда, а также пролиферация клеток внутри скаффолда была доказана с помощью МТТ теста. Для экспериментов использовали половозрелых кроликов породы Советская Шиншилла, по 6 животных в контрольной и экспериментальной группах (с имплантированной КИК). Дефект формировали бором диаметром 3 мм в нагружаемой зоне мыщелка коленного сустава и сразу же в экспериментальной группе имплантировали КИК. Животных выводили из эксперимента на 90 сутки после создания повреждения. Результаты оценивали визуально, с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и гистологического исследования (ГИ) и с оценкой по шкалам ICRS и O'Driscoll соответственно.

По данным СЭМ в контрольной группе наблюдалось увеличение размера повреждения с 3 мм до 5,5 мм, признаки дальнейшей дегенерации перифокальной области и значительное количество краевых трещин по периметру области интереса без видимых признаков пролиферации клеток. В экспериментальной группе наблюдалась фиксация КИК в области повреждения, пролиферация клеток на поверхности КИК, диаметр повреждения оставался прежним, хотя и визуализировался. По данным ГИ в контрольной группе полное отсутствие регенерата. В экспериментальной группе скаффолд уже не определяется, дефект спадается и уменьшается в размерах, на поверхности дефекта — толстый слой фиброзно-хрящевой ткани, в глубине — клеточная ткань по типу грануляционной, с большим количеством фибробластов, многоядерных клеток. Фиброзно-хрящевая ткань врастает в гиалиновый хрящ в краях дефекта, что обеспечивает фиксацию регенерата, что также определяется со стороны дна, под ней в крае дефекта — крупный участок новообразованного гиалинового хряща, на дне дефекта в регенерате — единичные новообразованные костные балки. Окраска по Массону визуализирует глубокие слои регенерата в фиолетовый цвет с прослойками красного, поля интактного хряща — в черно-фиолетовый, однако альциановым синим регенерат не окрашивается. Среднее количество баллов по шкалам ICRS и O'Driscoll в экспериментальной группе на 90 было 9 и 10 соответственно, а в контрольной группе 2 и 1 соответственно.

По результатам работы было показано, что разработанная КИК содержащая фибробласты и PLLA скаффолд, эффективна для регенерации гиалинового хряща. Мы предполагаем провести генетическую модификацию фибробластов для усиления их хондрогенного потенциала в составе КИК.

Работа выполнена при поддержке СПбГУ, проект ID 95445540 (121082000087-7), а также при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации грант 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

Список литературы

1. Galarraga J.H., Locke R.C., Witherel C.E., et al. Fabrication of MSC-laden composites of hyaluronic acid hydrogels reinforced with MEW scaffolds for cartilage repair // *Biofabrication*. 2021. Vol. 14, N 1. ID 014106. doi: 10.1088/1758-5090/ac3acb
2. Lee M.-S., Stebbins M.J., Jiao H., et al. Comparative evaluation of isogenic mesodermal and ectomesodermal chondrocytes from human iPSCs for cartilage regeneration // *Sci Adv*. 2021. Vol. 7, N 21. ID abf0907. doi: 10.1126/sciadv.abf0907

Болдырева М.А.^{1,2} ✉, Трубкина Е.И.^{1,2}, Агарёва М.Ю.^{1,3}, Мичурина С.С.¹, Стафеев Ю.С.¹, Парфёнова Е.В.^{1,3}

Сравнительный анализ морфофизиологических особенностей жировой ткани иглистых мышей *Acomys* sp. относительно классической модели *Mus Musculus*

¹ ФГБУ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, Россия

² НИУ ВШЭ, Москва, Россия

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

✉ mboldyreva@inbox.ru

Аннотация. В рамках данного исследования были выявлены морфофункциональные различия в структуре адипоцитов, активности липолиза и экспрессии ATGL у иглистых мышей *Acomys* sp. в сравнении с мышами *Mus musculus* линии C57BL/6J, что имеет важное значение для изучения механизмов распределения запасных липидов и понимания регуляции жирового обмена, а также открывает перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению метаболических расстройств.

Ключевые слова: иглистые мыши; *Acomys*; адипоциты; жировая ткань; ATGL.

Boldyreva M.A.^{1,2}, Trubkina E.I.^{1,2}, Agareva M.I.^{1,3}, Michurina S.S.¹, Stafeev I.S.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,3}

Comparative analysis of morphophysiological features of adipose tissue in *Acomys* sp. relative to the classical model *Mus Musculus*

¹ National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

² Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. This study identifies morphofunctional differences in adipocyte structure, lipolysis activity, and ATGL expression in spiny mice *Acomys* sp. compared to C57BL/6J *Mus musculus* mice. These findings are critical for elucidating the mechanisms underlying lipid storage distribution and the regulation of lipid metabolism, and they offer promising avenues for the development of therapeutic strategies to address metabolic disorders.

Keywords: spiny mice; *Acomys*; adipocytes; adipose tissue; ATGL.

Иглистые мыши, *Acomys* sp., представляют собой перспективную экспериментальную модель для изучения регенерации у взрослых млекопитающих благодаря своим уникальным физиологическим и биохимическим особенностям [1]. Эти животные продемонстрировали исключительные регенеративные способности, что делает их объектом интереса для исследователей, изучающих механизмы восстановления тканей. Параллельно с этим *Acomys* sp. обладают особенностями пищевого поведения, которые приближают их метаболические показатели к значениям, свойственным ожирению у человека [2, 3]. Однако молекулярные и клеточные особенности морфологии и физиологии жировой ткани у *Acomys* sp. в норме и при ожирении остаются недостаточно изученными, что подчеркивает необходимость дальнейших исследований в данной области.

В рамках нашего исследования мы сосредоточились на анализе особенностей жировой ткани у иглистых мышей *Acomys* sp. в сравнении с мышами *Mus musculus* линии C57BL/6J. Мы провели гистологический анализ для сравнения морфологической структуры жировой ткани между двумя видами, уделяя особое внимание строению адипоцитов в трех типах жировой ткани: подкожном, эпидидимальном и буром жире. Средний размер адипоцитов *Acomys* превышал размер адипоцитов C57BL в 2,3 раза в подкожном жире

и в 1,8 раз в висцеральном жире; в буром жире различий в размерах жировых клеток между линиями животных выявлено не было. Эти типы жировой ткани имеют различные функции и метаболические характеристики, что позволяет определить механизмы распределения запасных триглицеридов между различными жировыми депо.

Кроме того, мы предприняли попытку оценки активности липолиза через количественный анализ экспрессии адипоцитарной триглицеридлипазы (ATGL), ключевого фермента, участвующего в процессе липолиза и триацилглицеридного цикла адипоцитов. Изучение уровня экспрессии ATGL имеет критическое значение для понимания регуляции жирового обмена, а также открывает перспективы для разработки терапевтических подходов к лечению метаболических расстройств.

Результаты нашего исследования показали, что мыши *Acomys* значительно отличаются от C57BL/6J по уровням экспрессии ATGL, что указывает на наличие уникальных метаболических адаптаций у иглистых мышей. Наблюдаемые различия в структуре адипоцитов, активности липолиза и экспрессии ATGL подчеркивают важность этих адаптаций, которые могут быть связаны с их привычками питания и экологическими условиями обитания. Эти данные углубляют наше понимание физиологических различий и адаптаций *Acomys* и имеют важное значение для изучения механизмов распределения запасных липидов. Полученные результаты могут способствовать разработке новых подходов к лечению метаболических заболеваний, таких как ожирение и диабет, открывая новые горизонты для будущих исследований в этой области.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-15-00308.

Список литературы

1. Sandoval A.G.W., Maden M. Regeneration in the spiny mouse, *Acomys*, a new mammalian model // *Curr Opin Genet Dev.* 2020. Vol. 64. P. 31–36. doi: 10.1016/j.gde.2020.05.019
2. Shafrir E., Ziv E., Kalman R. Nutritionally induced diabetes in desert rodents as models of type 2 diabetes: *Acomys cahirinus* (spiny mice) and *Psammomys obesus* (desert gerbil) // *ILAR J.* 2006. Vol. 47, N 3. P. 212–224. doi: 10.1093/ilar.47.3.212
3. Shafrir E., Gutman A., Cohen A.M. Metabolic adaptation of spiny mice (*Acomys cahirinus*) transferred from the desert to laboratory diets // *Horm Metab Res.* 1974. N S4. P. 102–110.

Болтовская В.В.¹ ✉, Кулагина Л.Н.¹, Старикова Т.В.¹, Нефедова И.Ф.¹, Мякотных М.Н.², Миронов А.А.²

Способ получения гемопоэтических и мезенхимальных стромальных клеток из костного мозга человека

¹ ФГБОУ ВО СамГМУ МЗ России НИИ «Биотех», Самара, Россия

² ФГБОУ ВО СамГМУ МЗ России, Кафедра оперативной хирургии и клинической анатомии с курсом медицинских информационных технологий, Самара, Россия

✉ violetta.boltovskaya@yandex.ru

Аннотация. В литературных источниках описаны отдельные методы получения линий МСК или ГПК из одной пробы костного мозга. В данной работе мы описываем способ получения двух видов клеток из одной порции костного мозга. Данный метод позволяет избежать потери ценного и важного первичного материала.

Ключевые слова: костный мозг; мезенхимальные стромальные клетки; гемопоэтические клетки; регенеративная медицина; биотехнология.

Boltovskaya V.V.¹, Kulagina L.N.¹, Starikova T.V.¹, Nefedova I.F.¹, Myakotnykh M.N.², Mironov A.A.²

Method for obtaining hematopoietic and mesenchymal stromal cells from human bone marrow

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SamSMU Ministry of Health of Russia Research Institute “BioTech”, Samara, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education SamSMU Ministry of Health of Russia Department of Operative Surgery and Clinical Anatomy with a course of medical information technologies, Samara, Russia

Abstract. Our work describes a method for obtaining two types of cells, MSCs and HPCs, from one portion of bone marrow. Examination of the obtained lines using flow cytometry confirmed their identity. The proposed technique will avoid the loss of valuable primary material — bone marrow.

Keywords: bone marrow; mesenchymal stromal cells; hematopoietic cells; regenerative medicine; biotechnology.

Цель работы — разработка способа одновременного получения двух линий клеток: мезенхимальных стромальных (МСК) и гемопоэтических (ГПК) из одной пробы костного мозга.

В литературных источниках описаны отдельные методы получения линий МСК или ГПК из одной пробы костного мозга [1–3].

Взятие костного мозга проводили в условиях операционной с соблюдением всех правил асептики и антисептики. Аспирировали костный мозг при помощи стерильной иглы в шприц с гепарином из расчета 1 мл (5 000 ЕД) на 20 мл костного мозга. Чтобы предотвратить свертывание костного мозга, шприц неоднократно встряхивали и доставляли в течение часа в лабораторию культур клеток.

Выделение мононуклеаров проводили в градиенте плотности при помощи холодной центрифуги. Отбирали фракцию клеток над фикольным кольцом и трижды отмывали в 0% питательной среде. В образовавшийся осадок вносили 10% питательную среду и хорошо суспензировали, затем переносили в культуральный флакон. Культивирование осуществляли в условиях CO₂ инкубатора при постоянной влажности и температуре. Через 3 дня проводили полную смену среды. Отбирали кондиционированную среду, в которой находились неприславшие гемопоэтические клетки, в отдельную центрифужную пробирку. В культуральный флакон с прикрепившимися ко дну МСК вносили свежую полную питательную среду. Центрифужную пробирку с находящимися в кондиционированной среде ГПК центрифугировали при помощи холодной центрифуги. Затем надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок, содержащий гемопоэтические

клетки, оставляли для дальнейшей работы. Для получения гемопоэтических клеток с 95–96% чистотой по CD 34+ использовали набор Easy Sep™ Human CD34 Positive Selection Kit и магнит для сепарации клеток Easy Sep (SEMCELL TECHNOLOGIES США) по протоколу производителя. Фенотип полученных МСК и ГПК определяли методом проточной цитометрии. Фенотип гемопоэтических клеток: CD45+, CD34+, CD14+, CD19+, а МСК: CD45-/CD34-/CD14-/CD19-/CD90+/ CD105+/ CD73+. Данный способ подтвердил получение из одной порции костного мозга двух видов клеток: стромальных и гемопоэтических. Данный метод может быть использован в регенеративной медицине.

Список литературы

1. Патент РФ на изобретение № 2323252С1 от 25.10.2006. Колесникова А.И. Способ культивирования мезенхимальных стволовых клеток человека *ex vivo*.
2. Патент РФ на изобретение № 2745040 от 29.06.2020. Николаева Л.П. Способ получения стволовых клеток.
3. Патент РФ на изобретение № 2 303 632 С1. Кругляков П.В., Полицев Д.Г., Вийде С.К., Кислякова Т.В. Способ получения мезенхимальных стволовых клеток из костного мозга млекопитающих и популяция мезенхимальных стволовых клеток, полученная этим способом.

Бондаренко Н.А.¹✉, Суровцева М.А.¹, Ким И.И.¹, Остапец С.В.², Косарева О.С.²,
Дровосеков М.Н.², Повещенко О.В.¹

Мезенхимальные стволовые клетки из жировых тел Биша для регенерации костной ткани

¹ НИИКЭЛ — филиал ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО НГМУ МЗ РФ, Новосибирск, Россия

✉ bond802888@yandex.ru

Аннотация. МСК из жировых тел Биша обладают высокой пролиферативной и низкой миграционной активностью, активно продуцируют щелочную фосфатазу под влиянием ЭПО, совместимы с титановыми имплантатами, способствуют регенерации костной ткани, что свидетельствует об их перспективности для остеоиндукции.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; жировая ткань Биша; пролиферация; миграция; остеогенная дифференцировка; эритропоэтин.

Bondarenko N.A.¹, Surovtseva M.A.¹, Kim I.I.¹, Ostapets S.V.², Kosareva O.S.²,
Drovoikov M.N.², Poveshchenko O.V.¹

Mesenchymal stem cells from Bisha fat bodies for bone tissue regeneration

¹ NIICEL — branch of FIC Institute of cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² FGBOU VO NSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novosibirsk, Russia

Abstract. MSCs from fat bodies of Bisha have high proliferative and low migration activity, actively produce alkaline phosphatase under the influence of EPO, are compatible with titanium implants, promote bone tissue regeneration, which testifies to their prospectivity for osteoinduction.

Keywords: mesenchymal stem cells; Bisha adipose tissue; proliferation; migration; osteogenic differentiation; erythropoietin.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) в течение последних лет активно применяются в лечении многих патологических заболеваний. Альтернативным и доступным источником МСК по сравнению с костным мозгом является подкожно-жировая клетчатка. В последнее время появились исследования о возможности получения МСК из буккального жирового тела (Б-МСК), или, по-другому, жировых комков Биша [1]. Показано, что введение Б-МСК успешно восстанавливает костные дефекты челюсти [2]. Имплантаты из титана успешно используются для реконструкции костей в стоматологической хирургии, поскольку сочетают в себе превосходные механические свойства, стойкость к коррозии, биосовместимость и возможность к остеоинтеграции [3].

Целью данного исследования является изучение функциональных свойств Б-МСК в сравнении с МСК из костного мозга (к.м.-МСК) и жира (ж-МСК) и оценка потенциала Б-МСК в регенерации костной ткани.

МСК были выделены из буккальных жировых подушек, полученных при хирургическом вмешательстве. Культуру к.м.-МСК получали из адгезивных мононуклеаров костного мозга. ж-МСК выделяли из стромально-васкулярной фракции жировой ткани. Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% Gluta-MAX, 40 мкг/мл гентамицина при 37°C и 5% CO₂. Интенсивность пролиферации МСК оценивали в МТТ-тесте под влиянием 10% обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Миграционную активность МСК из разных источников оценивали под влиянием 10% ОТП

на аппарате xCELLigence System. Дифференцировку в остеобласты проводили в остеогенной среде 21 день. Уровень щелочной фосфатазы (ЩФ) после дифференцировки МСК без и с добавлением эритропоэтина (ЭПО) 33 МЕ/мл определяли с помощью коммерческого набора. Б-МСК и остеобласты высевали на образцы титана в количестве 160×10^3 клеток на образец и культивировали в течение 3, 8 и 15 суток. Количество адгезивных, живых, апоптотических и некротических клеток, на образцах титана, определяли окрашиванием акридиновым оранжевым и этидиумом бромидом. Самцам крыс ($n = 60$) под общей анестезией производили разрез в проекции теменной кости, затем выполняли дефект 4×3 мм в пределах твердой мозговой оболочки. Сформированный дефект в теменной кости заполняли Б-МСК на коллагеновой губке с последующим закрытием пористой сеткой из никелида титана (NiTi), а в контрольной группе дефект не заполнялся, заживление происходило под кровяным сгустком. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Изучение пролиферативной активности выявило достоверно более высокий уровень пролиферации Б-МСК (0,98 ЕОП) по сравнению с к.м.-МСК (0,66 ЕОП) и ж-МСК (0,78 ЕОП). Добавление ОТП статистически значимо увеличивало пролиферацию МСК из всех источников по сравнению с ЭТС. Пролиферация Б-МСК — 1,16 ЕОП в присутствии ОТП была статистически значимо выше по сравнению с Ж-МСК — 0,94 ЕОП. Миграционная активность МСК из всех источников была сопоставимой как при добавлении ЭТС, так и ОТП в течение 20 часов наблюдения. С 24 ч миграционная активность Б-МСК, Ж-МСК была ниже по сравнению с КМ-МСК как при добавлении ЭТС, так и ОТП. К концу срока наблюдения миграционная активность КМ-МСК составила $KI = 1,54$, что статистически значимо выше по сравнению с Ж-МСК $KIA = 0,65$ и Б-МСК $KI = 0,45$ при добавлении ОТП. При остеогенной дифференцировке Б-МСК дифференцировались в остеобласты с характерным окрашиванием ализариновым красным. Под влиянием ЭПО дифференцировка в остеобласты усиливалась. После остеогенной дифференцировки увеличивался уровень ЩФ в кондиционной среде с $0,06 \pm 0,02$ до $0,35 \pm 0,04$ Е/л и в лизате клеток с $0,31 \pm 0,08$ до $4,43 \pm 0,3$ Е/л. Количество культивированных Б-МСК на образцах титана значимо прирастало на 8 сут и 15 сут по сравнению с 3 сут. Жизнеспособность Б-МСК на образцах титана снижалась на 8 сут культивирования (86%), по сравнению с 3 сут (100%) и восстанавливалась к 15 сут (99%). Снижение жизнеспособности Б-МСК на 8 сут связано с увеличением количества апоптотических клеток по сравнению с 3 сут и 15 сут культивирования на 13% и 12%, соответственно. Гистологическое исследование костной ткани из области дефекта через 2 недели после введения Б-МСК не выявило различий в сравнении с контролем. Через 1 месяц после введения клеток область дефекта заполнена фиброретикулярной тканью с полями остеоида, примитивными костными балками без признаков воспалительной реакции, в то время как в контрольной группе воспаление приняло продуктивный характер. Через 3 месяца после введения Б-МСК в зоне дефекта сформировалась зрелая губчатая костная ткань. В межбалочных пространствах располагался миелоидный костный мозг.

Б-МСК обладают большей пролиферативной активностью в сравнении с МСК жира, костного мозга под влиянием 10% ОТП, невысокой миграционной активностью, в большей степени продуцируют ЩФ под влиянием ЭПО, адгезируют к поверхности титановых имплантатов и остаются жизнеспособными, способствуют более быстрой регенерации костной ткани *in vivo*. Благодаря такому функциональному потенциалу Б-МСК являются перспективными для остеоиндукции, в частности в стоматологии.

Список литературы

1. Genova T., Cavagnetto D., Tasinato F., et al. Isolation and characterization of Buccal fat pad and dental pulp MSCs from the same donor // Biomedicines. 2021. Vol. 9, N 3. ID 265. doi: 10.3390/biomedicines9030265
2. Meshram M., Anchlia S., Shah H., et al. Buccal fat pad-derived stem cells for repair of maxillofacial bony defects // J Maxillofac Oral Surg. 2019. Vol. 18. P. 112–123. doi: 10.1007/s12663-018-1106-3
3. Das S., Dholam K., Gurav S., et al. Accentuated osseointegration in osteogenic nanofibrous coated titanium implants // Sci Rep. 2019. Vol. 9. ID 17638. doi: 10.1038/s41598-019-53884-x

Боровикова С.Е.¹ ✉, Круглова Н.А.¹, Тюкачева Е.А.¹, Лужин А.В.¹, Ульянов С.В.¹, Мазуров Д.В.², Шепелев М.В.¹

Конструирование и оптимизация библиотеки GPI-заякоренных пептидов для скрининга в вирусологических тестах

¹ Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

² Йельская школа медицины, Нью-Хейвен, США

✉ borovikova_sofiya@mail.ru

Аннотация. Перспективным методом лечения ВИЧ-инфекции является генная терапия с помощью клеток, несущих на мембране пептидные ингибиторы слияния ВИЧ, в частности пептид 2P23. В данной работе с помощью генетически-кодируемой библиотеки пептидов на основе 2P23 ведется поиск новых защитных пептидов против ВИЧ.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека (ВИЧ); ингибиторы слияния; нокин; библиотека пептидов.

Borovikova S.E.¹, Kruglova N.A.¹, Tiukacheva E.A.¹, Luzhin A.V.¹, Ulianov S.V.¹, Mazurov D.V.², Shepelev M.V.¹

Design and optimization of the library of GPI-anchored peptides for screening in virological tests

¹ Institute of Gene Biology, Moscow, Russia

² Yale School of Medicine, New Haven, USA

Abstract. A promising strategy of treating HIV infection is gene therapy using cells carrying fusion inhibitory peptides on the surface, in particular the peptide 2P23. In this work, we use a genetically-encoded library of peptides based on 2P23 to find new protective inhibitors of HIV infection.

Keywords: human immunodeficiency virus (HIV); fusion inhibitors; knock-in; peptide library.

Поиск лекарства от инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), является актуальной задачей. Перспективным подходом к лечению ВИЧ-инфекции является генная терапия, при которой у пациента изымают клетки, подвергают их модификации *ex vivo*, а затем возвращают в организм. Среди различных стратегий модификации генома перспективной представляется встраивание конструкций, кодирующих заякоренные на мембране клетки пептидные ингибиторы слияния ВИЧ. Мембраносвязанные пептидные ингибиторы препятствуют проникновению ВИЧ в клетки на этапе слияния вирусной и клеточной мембран и, таким образом, защищают клетку от инфекции. Одними из наиболее эффективных ингибиторов слияния являются пептиды 2P23 и МТ-С34 [1]. Ранее в нашей лаборатории была создана конструкция для экспрессии пептидных ингибиторов слияния, в которой пептиды включены в состав короткой GPI-заякоренной молекулы CD52 и таким образом локализуются на плазматической мембране [2]. Небольшой размер донорной генетической конструкции, кодирующей последовательность пептида, является главным её преимуществом для последующего редактирования генома с помощью технологии CRISPR/Cas9. Однако при встраивании конструкции с 2P23 в геном клеток, уровень пептида 2P23 на мембране был низким по сравнению с уровнем пептида МТ-С34 [2]. Было выдвинуто предположение, что данный эффект связан с присутствием сайта N-гликозилирования, который есть в составе МТ-С34, но отсутствует в 2P23. Поскольку поверхностный уровень пептида напрямую связан с эффективностью ингибирования инфекции, мы дополнительно ввели сайты N-гликозилирования на N-конец, C-конец или оба конца пептида 2P23. Это способствовало увеличению уровня 2P23 на мембране, в особенности для формы с двумя модификациями, однако этого было недостаточно для того, чтобы достичь столь же высокого уровня, как для МТ-С34, и добиться полного ингибирования инфекции. Мы предположили, что, модифицируя последовательности

аминокислот на N- и C-концах пептида, можно найти новые варианты с высоким уровнем представленности на мембране. Для поиска таких вариантов была создана библиотека с тремя рандомизированными аминокислотами на N- и C-концах пептида 2P23. Для этого был заказан синтез олигонуклеотидов, один из которых содержал рандомизированные участки с NNK-повторами, где N — любой нуклеотид, а K — G или T. На основе библиотеки олигонуклеотидов с NNK был клонирован плазмидный лентивирусный вектор. Полученную библиотеку плазмид использовали для наработки лентивирусных частиц, которыми заражали клоны модифицированных культур НЕК 293Т/CD4/CCR5 и СЕМ/CCR5. После трансдукции клетки окрашивали антителами против 2P23 и оценивали уровень пептида на поверхности с помощью проточной цитометрии. Клетки с представленной на поверхности библиотекой пептидов были подвергнуты нескольким раундам сортировки и протестированы в вирусологических тестах с реплицирующимся вирусом ВИЧ-1. Из клеток до и после вирусологической селекции была выделена геномная ДНК, с неё получен ПЦР-продукт, который отправлен на NGS-анализ для определения нуклеотидных последовательностей, кодирующих отобранные в ходе селекции пептиды. По результатам анализа данных секвенирования были выбраны 12 пептидов для последующего тестирования. Пептиды с наибольшим уровнем представленности на мембране будут в дальнейшем протестированы в экспериментах на межклеточную передачу вируса и в условиях инфекции с реплицирующимся ВИЧ-1. Данная работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00381).

Список литературы

1. Xiong S., Borrego P., Ding X., et al. A Helical short-peptide fusion inhibitor with highly potent activity against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and simian immunodeficiency virus // *J Virol*. 2016. Vol. 91, N 1. ID e01839-16. doi: 10.1128/JVI.01839-16
2. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via Knock-In of peptides from the heptad repeat 2 Domain of gp41 // *mBio*. 2022. Vol. 13, N 1. ID e0358921. doi: 10.1128/mbio.03589-21

Боярская Н.В. ✉, Скорцану О.И., Успенский В.Е., Щербинин Т.С., Филиппов А.А., Пищугин А.С.,
Галяутдинов И.В., Малашичева А.Б.

Влияние пиностробина и его производных на патологическую кальцификацию аортального клапана

ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

✉ nad.vb@yandex.ru

Аннотация. В ходе исследования было показано ингибирующее влияние флавоноида — пиностробина на сигнальный путь Notch и снижение патологической кальцификации в интерстициальных клетках аортального клапана человека.

Ключевые слова: пиностробин; ингибирование патологической кальцификации аортального клапана; Notch-сигналинг; интерстициальные клетки аортального клапана.

Boyarskaya N.V., Skortsanu O.I., Uspensky V.E., Shcherbinin T.S., Filippov A.A., Pishchugin A.S.,
Galyautdinov I.V., Malashicheva A.B.

The effect of pinostrobin and its derivatives on pathological calcification of the aortic valve

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study showed the inhibitory effect of the flavonoid pinostrobin on the Notch signaling pathway and a decrease in pathological calcification in the interstitial cells of the human aortic valve.

Keywords: pinostrobin; inhibition of pathological calcification of the aortic valve; Notch signaling; interstitial cells of the aortic valve.

Патологическая кальцификация сердечно-сосудистой системы может быть самостоятельной патологией или развиваться как осложнение при различных заболеваниях. Кальцинирующей болезнью аортального клапана (КБАК) подвержено значительное количество пациентов с патологиями сердечно-сосудистой системы. Заболевание смертельно и единственным вариантом лечения является хирургическая замена клапана.

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

Цель исследования выяснить влияние флавоноида пиностробина и его производных на патологическую кальцификацию аортального клапана. Флавоноиды обладают широким спектром полезных для здоровья свойств, включая антибактериальные, противовирусные, противомикробные, противовоспалительные, противоаллергические, иммуномодулирующие, сосудорасширяющие и кардиопротекторные свойства [1].

Из операционного материала пациентов с КБАК были выделены ИКК, в которых индуцировали остеогенную дифференцировку и добавляли флавоноиды — потенциальные ингибиторы Notch сигналинга: пиностробин, оксим пиностробина, лактам пиностробина, пиностробин халкон, 20-гидроксизекдизон, 2,5-диметоксикоричная кислота и без них. Определяли токсичность и смертельную дозу веществ, оценивали пролиферацию клеток под воздействием пиностробина и его производных. Степень дифференцировки исследовали с помощью ПЦР в реальном времени, анализировали уровень экспрессии маркеров остеодифференцировки. Проводили спектрофотометрический анализ после окрашивания Ализариновым красным кальциевых отложений в клетке.

Токсичность определяли при концентрациях 1,4 мкг/мл, 2,7 мкг/мл, 8,1 мкг/мл, 13,5 мкг/мл. Было показано, что концентрация 13,5 мкг/мл приводила к гибели клеток через 48–96 часов, концентрация 8,1 мкг/мл приводила к гибели клеток через 7–21 день, концентрации 1,4 мкг/мл и 2,7 мкг/мл не приводили к видимой гибели клеток. Оценка пролиферации показала снижение количества клеток при 8,1 мкг/мл на ~50%, при 2,7 мкг/мл ~30%, при 1,4 мкг/мл ~15% на временной точке 96 часов у пиностробина, у остальных флавоноидов, производных пиностробина, пролиферация снизилась на 30–50%. Подавление кальцификации наблюдалось только при воздействии пиностробином в концентрации 2,7 мкг/мл. Нами было показано, что экспрессия гена маркера остеогенной дифференцировки RUNX2 снижается при воздействии пиностробином, также было показано снижение концентрации отложений кальцификатов.

Таким образом можно сделать выводы о том, что пиностробин в концентрации 2,7 мкг/мл может быть использован для подавления сигнального пути Notch и снижения кальцификации в ИКК. Производные пиностробина токсичны для клеток и не вызывают уменьшение кальцификации в клетках.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Список литературы

1. Chiorcea-Paquim A.-M. Electrochemistry of flavonoids: A comprehensive review // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 21. ID 15667. doi: 10.3390/ijms242115667

Брюховецкий А.С. ✉, Долгополов И.С.

Персонализированная медицина нового поколения: генно-ориентированная и протеом-основанная ультраранняя молекулярная диагностика и эпигенетическая CHIP– фокусированная терапия неинфекционных болезней цивилизации

АО Клинический госпиталь «НЕЙРОВИТА», Москва, Россия

✉ neurovita-as@mail.ru

Аннотация. NGS-полногеномные и протеомные исследования гемопоэтических стволовых клеток и лейкоцитов выявили клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом (CHIP) и доминирующие клоны при ряде фатальных болезней. Разработана щадящая терапевтическая CHIP-фокусированная стратегия реконституции костного мозга.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки; мононуклеарные клетки периферической крови; клональный гемопоэз; клональный гемопоэз с неопределенным потенциалом; болезни цивилизации; аутоиммунные заболевания; нейродегенеративные заболевания; стволовые клетки.

Bryukhovetskiy A.S., Dolgoplov I.S.

New generation personalized medicine: gene-targeted and proteome-based ultra-early molecular diagnostics and epigenetic CHIP-focused therapy of non-infectious civilization diseases

AO NeuroVita Clinical Hospital, Moscow, Russia

Abstract. Whole genome next generation sequencing and proteomic tests of hematopoietic stem cells and WBCs detected clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) and dominant clones in a number of fatal diseases. A sparing therapeutic CHIP-focused strategy for bone marrow reconstitution was developed.

Keywords: hematopoietic stem cells; PBMCs; clonal hematopoiesis; clonal hematopoiesis of indeterminate potential; civilization diseases; autoimmune diseases; neurodegenerative diseases; stem cells.

Существующие подходы персонализированной медицины (ПМ) предполагают выявление исключительно герминогенных полиморфизмов и патоспецифических белков как продуктов их функционирования. Подобная молекулярная диагностика важна, нужна и позволяет выявлять большинство наследственных болезней и врожденные генетические дефекты при целом ряде фатальных неинфекционных болезней цивилизации (БЦ), но сужает манипуляции с генами и ограничивает терапевтические возможности ПМ. Смещение фокуса ПМ с высокодифференцированных клеток на низкодифференцированные стволовые клетки и клетки-предшественники, обусловлено новым пониманием значения дополнительных соматических мутаций (ДСМ) и их роли в патогенезе БЦ. ДСМ становятся новыми биомаркерами ПМ нового поколения. Одним из научных прорывов 21-го века стало открытие клонального гемопоэза с неопределенным потенциалом (англ. clonal hematopoiesis of indeterminate potential — CHIP), как фундаментальной причины старения, прогрессирования и рецидивов сердечно-сосудистых заболеваний, солидных опухолей, циррозов печени, ожирения и др. Ранее CHIP диагностировался только при онкогематологических заболеваниях. Уничтожение CHIP-клонов ГСК путем трансплантации костного мозга (ТКМ) устраняет патологическую моноклональность гемопоэза и позволило добиться 100% излечения от рака крови и лимфом.

Целью нашей работы явилась разработка универсальной биотехнологической генно-ориентированной и протеом-основанной биомедицинской платформы ПМ нового поколения для клональной реституции гемопоэза и СНИР-основанной терапии при основных неуклонно прогрессирующих неинфекционных болезнях цивилизации, осложненных СНИР, и профилактика их рецидивов.

Наши NGS-полногеномные исследования экзема 22000 генов и протеомные исследования иммунома ГСК и лейкоцитов периферической крови (ПК) у 85 больных (15 больных с аутоиммунными заболеваниями (АИЗ), 15 больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (ССЗ), 15 пациентов с солидными злокачественными новообразованиями (ЗНО), 15 больных с наследственными моногенными болезнями (НМГБ)) подтвердили наличие доминирующих СНИР-клонов ГСК и лейкоцитов у этих пациентов. Нам удалось диагностировать СНИР-клоны ГСК у 25 больных с нейродегенеративными болезнями (НДБ): болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, фронто-темпоральная деменция и др. Мы обнаружили, что СНИР-клоны ГСК при НДБ кардинально отличаются по представленности и частоте аллельных вариантов (ЧАВ) ДСМ в генах клональности и в генах стволовости от СНИР-клонов ГСК при старении, ССЗ, ЗНО и АИЗ.

В рамках предложенной концепции управления СНИР-клонами ГСК нами была разработана принципиально новая по целеполаганию и не имеющая мировых аналогов биомедицинская платформа клональной реституции гемопоэза пациентов с АИЗ, НДБ, ССЗ, НМГЗ и ЗНО с минимальной остаточной болезнью, направленная на геноконтролируемое и протеом-основанное истощение (деплецию) СНИР-клонов ГСК путем технологии геномного балансирования хроматина ГСК с использованием двуцепочечных ДНК (дцДНК) человека в комплексе с рядом программных иммуносупрессивных и фармакогеномных воздействий. Подтвержденное NGS и иммунофенотипированием мембранных белков иммунома ГСК присутствие СНИР-клонов ГСК, позволяет сделать их основными мишенями генно-ориентированной и протеом-основанной терапии. СНИР-клоны ГСК и мутации генов клональности становятся основными мишенями таргетной (молекулярно-нацеленной) терапии. Главной целью терапии является реконституция (реституция, восстановление как до болезни) врожденного иммунитета пациента с СНИР-клонами ГСК и смена системного ответа его организма, подтверждаемая на уровне ДСМ генов клональности. Генно-ориентированный и протеом-основанный мониторинг молекулярно-биологических параметров ГСК является основным критерием оценки эффективности терапии. Персонализированное геноспецифическое воздействие на функциональный контекст секретора конкретных СНИР-мутаций генов клональности и генов стволовости доминирующих СНИР-клонов ГСК обеспечивается геносупрессивными, геноблокирующими и геномодулирующими фармакогеномными воздействиями, с использованием минимальных доз разрешенных лекарственных препаратов, что позволяет прецизионно (высокоточно) убрать или значительно уменьшить основные симптомы и синдромы БЦ.

В настоящее время в мире создаются СНИР-фокусированные медицинские клиники, где врачи, опираясь на данные NGS, дают рекомендации в соответствии с выявленными мутациями генов клональности, позволяющие заблокировать функцию мутантного гена и получить позитивный эффект от терапии. Однако работа с блокированием функции одного мутированного гена СНИР не обеспечивает нужного эффекта, и мы предлагаем свой метод коррекции клонального гемопоэза. Кроме того, хоть ТКМ и является оптимальным способом реконституции иммунитета и смены системного иммунного ответа при фатальных БЦ, она ведет к летальному исходу в 6–10% случаев, а в 60% случаев дает витальные осложнения. СНИР-терапия достигает тех же эффектов постепенно, практически безопасна из-за малых доз геноспецифического агента и блокирует определенные функции ГСК, но не может заблокировать или убрать полностью несколько клонов. Инновационная стратегия клональной реконституции гемопоэза путем постепенного истощения доминирующих клонов ГСК, дополненная СНИР-фокусированной эпигенетической терапией, способна многократно увеличить эффективность терапии ряда фатальных БЦ.

Букатин А.С.^{1,2} ✉, Плешаков П.С.¹, Тюшкевич А.А.¹, Белоусова Д.А.¹, Филатов Н.А.¹

Микрофлюидная платформа для высокопроизводительного синтеза клеточных сфероидов для регенеративной медицины и 3D-биопечати

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет им. Ж.И. Алферова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ antbuk.fiztek@gmail.com

Аннотация. В данном исследовании на основе технологий капельной микрофлюидики разработан простой и надежный способ синтеза клеточных сфероидов в альгинатных микрогелях и водных эмульсиях. Сфероиды демонстрировали выживаемость более 80% и рост до диаметра свыше 100 мкм в течение 15 дней культивирования.

Ключевые слова: микрофлюидное устройство; микрофлюидный чип; капельная микрофлюидика; клеточный сфероид; гидрогель; альгинат; биочернила; биопечать.

Bukatın A.S.^{1,2}, Pleshakov P.S.¹, Tushkevich A.A.¹, Belousova D.A.¹, Filatov N.A.¹

Microfluidic platform for high throughput synthesis of cell spheroids for regenerative medicine and 3D bioprinting

¹ Alferov Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute for Analytical Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Here we present a simple and reliable method for synthesis of cell spheroids in alginate microgels and aqueous emulsions, which is based on droplet microfluidics. The spheroids demonstrated a survival rate of over 80% and grew to a diameter of over 100 μm within 15 days of cultivation.

Keywords: microfluidic device; microfluidic chip; droplet microfluidics; cell spheroid; hydrogel; alginate; bioink; bioprinting.

В настоящее время клеточные сфероиды рассматриваются перспективным объектом для применения в регенеративной медицине и для использования в качестве ключевого компонента биочернил для 3D-печати [1, 2]. Основным методом синтеза клеточных сфероидов является метод висячей капли или использование слабо адгезивных подложек из агарозы с микролунками. Альтернативным методом формирования клеточных сфероидов является использование технологий капельной микрофлюидики для изолирования группы клеток в каплях эмульсии «вода в масле» [3]. В связи с тем, что частота генерации таких капель достигает нескольких тысяч штук в секунду, количество сфероидов, получаемых в одном эксперименте, может составлять десятки тысяч. В настоящей работе разработана микрофлюидная платформа для получения клеточных сфероидов в альгинатных микрогелях и в каплях двойной эмульсии «вода-масло-вода». Платформа отличается простотой использования, так как в своем составе содержит только микрофлюидный чип с генератором эмульсий с фокусировкой потока, вакуумный насос и регулятор давления [4]. Движение жидкостей в микрофлюидном чипе осуществляется за счет создания в выходном резервуаре отрицательного давления. При этом расходы жидкостей в каждом канале определяются геометрическими размерами каналов микрочипа, влияющих на гидравлическое сопротивление, что обеспечивает высокую воспроизводимость результатов. За счет использования микрофлюидных чипов с разной геометрией каналов в них возможно

синтезировать не только сферические микрочастицы, но и двухслойные микрочастицы и микрочастицы со структурой Януса с разным составом слоев.

Для получения клеточных сфероидов в микрофлюидном чипе происходит формирование альгинатных микрочастиц (микрорегелей) диаметром 150–200 мкм, в которые упаковывались клетки аденокарциномы толстого кишечника мыши, экспрессировавшие зеленый флуоресцентный белок CT26-EGFP. Синтез альгинатных микрочастиц происходил во фторуглеродном масле Novac 7500 (3M) с добавлением поверхностно-активного вещества PicoFurf (Dolomite microfluidics) в концентрации 1%. Производительность синтеза достигала 200 мкл микрочастиц в час. После шивки гидрогеля внутри эмульсии ионами кальция частицы отмывались от масла и переводились в питательную среду для дальнейшего культивирования. Культивирование клеток в таких микрочастицах в течение 15 дней показало, что по результатам окрашивания мертвых клеток йодистым пропидием более 80% клеток сохраняют жизнеспособность в альгинатных микрочастицах. При этом если после упаковки клетки представляют собой отдельные кластеры, то на 3–5-й день они срастаются в клеточные сфероиды, которые увеличивают свой размер до ~100–150 мкм на 15-й день наблюдения.

За счет изменения конфигурации каналов в микрофлюидном чипе в разработанной микрофлюидной платформе возможно формирование капель двойной эмульсии «вода-масло-вода». В этом случае для синтеза клеточных сфероидов применение альгинатного гидрогеля не требуется. В течение 4–6 часов после упаковки отдельные клетки формируют в каплях двойной эмульсии клеточные кластеры, которые затем переводятся в питательную среду для дальнейшего культивирования. На 3-й день развития клеточные кластеры образуют клеточные сфероиды, которые продолжают активно развиваться, увеличиваясь в размерах на 7-й день культивирования более чем в 2 раза, достигая 250 мкм в диаметре, что показывает высокую пролиферативную активность и жизнеспособность клеток. Однако на 7-й день культивирования из-за достижения большого размера сфероидов в них было замечено формирование некротического ядра, что ограничивает длительность роста клеточных сфероидов *in vitro* без васкуляризации.

Основным результатом работы является разработанная технология высокопроизводительного синтеза клеточных сфероидов в альгинатных микрорегелях (микрочастицах) и каплях двойной эмульсии. В основе технологии лежит синтез одинарных и двойных эмульсий, а также гидрогелевых микрочастиц в них. За счет того, что геометрия каналов микрофлюидного чипа полностью определяет параметры течения жидкости, синтез эмульсий и микрочастиц является крайне стабильным и воспроизводимым, достигая производительности 200 мкл/час по гидрогелю (эмульсии). Полученные результаты по развитию клеток и клеточных сфероидов показывают отсутствие повреждений клеток при движении по каналам микрофлюидного чипа, а также благоприятность условий внутри капель эмульсии и микрорегелей. В работе была показана возможность использования полученных сфероидов для печати трехмерных структур. Данная технология может быть востребована при тестировании лекарственных препаратов, в регенеративной медицине и в качестве основы биочернил для 3D-печати тканей и органов. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 20-74-10117.

Список литературы

1. Griffin K.H., Fok S.W., Kent Leach J. Strategies to capitalize on cell spheroid therapeutic potential for tissue repair and disease modeling // *npj Regen Med.* 2022. Vol. 7. ID 70. doi: 10.1038/s41536-022-00266-z
2. Decarli M.C., Seijas-Gamardo A., Morgan F.L.C., et al. Bioprinting of stem cell spheroids followed by post-printing chondrogenic differentiation for cartilage tissue engineering // *Adv Healthcare Mater.* 2023. Vol. 12, N 19. 2203021. doi: 10.1002/adhm.202203021
3. Sart S., Ronteix G., Jain S., et al. Cell culture in microfluidic droplets // *Chem Rev.* 2022. Vol. 122, N 7. P. 7061–7096. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00666
4. Filatov N.A., Evstropov A.A., Bukatin A.S. Negative pressure provides simple and stable droplet generation in a flow-focusing microfluidic device // *Micromachines.* 2021. Vol. 12, N 6. ID 662. doi: 10.3390/mi12060662

Булычева Ю.И.¹ ✉, Астрелина Т.А.¹, Маливанова Т.Ф.¹, Кобзева И.В.¹, Никитина В.А.¹, Сучкова Ю.Б.¹,
Усупжанова Д.Ю.¹, Брунчуков В.А.¹, Михадаркина О.Г.¹, Цимахович А.О.², Серова О.Ф.², Самойлов А.С.¹

STR-анализ мезенхимальных стромальных клеток комплекса плацентарной ткани

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ МО Московский областной перинатальный центр, Балашиха, Россия

✉ boulychevayuli@yandex.ru

Аннотация. STR-анализ позволяет выявить генетически гетерогенный состав клеточных культур мезенхимальных стромальных клеток комплекса плацентарной ткани. Наши исследования показали, что и однородные, и смешанные культуры МСК могут выделяться из различных тканей первичного материала плаценты.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; STR-анализ; метод тандемных повторов; плацентарная ткань.

Bulycheva Yu.I.¹, Astrelina T.A.¹, Malivanova T.F.¹, Kobzeva I.V.¹, Nikitina V.A.¹, Suchkova Yu.B.¹,
Usupzhanova D.Yu.¹, Brunchukov V.A.¹, Mikhadarkina O.G.¹, Tsimakhovich A.O.², Serova O.F.², Samoilov A.S.¹

STR analysis of mesenchymal stromal cells of the placental tissue complex

¹ State Research Center — Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Moscow Regional Perinatal Center, Balashikha, Russia

Abstract. STR analysis allows to identify the genetically heterogeneous composition of cell cultures of mesenchymal stromal cells of the placental tissue complex. Our studies have shown that both homogeneous and mixed MSC cultures can be isolated from various tissues of the primary placental material.

Keywords: mesenchymal stromal cells; STR-analysis; short-tandem repeats analysis; placental tissue.

В последние десятилетия изучение свойств мезенхимальных стромальных клеток (МСК) является одним из приоритетных направлений в современной науке благодаря их биологическим характеристикам и терапевтическому потенциалу. Одним из перспективных и доступных источников являются плацентарные ткани человека. МСК плаценты при культивировании устойчивы к спонтанной трансформации [1] и могут быть оптимальным ресурсом для аллогенной трансплантации. Однако из-за гетерогенности тканей и двойственности генетического происхождения плаценты необходимо идентифицировать принадлежность (матери или плода) полученных клеток. Анализ коротких тандемных повторов (STR-анализ) является оптимальным методом для генетической идентификации клеток. Известно, что клеточные культуры МСК хориона в 30% случаев контаминированы клетками матери [2], однако генетическую идентификацию МСК плаценты проводят лишь в небольшом количестве исследований. Цель исследования — проведение генетической идентификации клеток комплекса плацентарной ткани методом коротких тандемных повторов.

В исследование включено 54 неперсонифицированных образца клеточных культур МСК комплекса плацентарной ткани (P0-P3) от 15 плацент, полученных от здоровых рожениц в возрасте от 22 до 39 лет (средний возраст составил $29 \pm 3,7$ года) при отсутствии стандартных противопоказаний к донорам с одноплодной, физиологически протекавшей беременностью, закончившейся нормальными родами после подписания информированного согласия. Выделение ДНК клеточных культур проводили набором Extract DNA Blood&Cells («Евроген», Россия), анализ полиморфизма STR (Short tandem repeat) — набором COrDIS Plus (ООО «Гордиз») на генетическом анализаторе ABI 3500 (Applied Biosystems, US), обработку результатов

фрагментного анализа проводили в программе GeneMapper 1.7. В качестве контроля использовали ДНК, выделенную из крови матери.

Выявлено, что 42 (77,8%) образца МСК комплекса плацентарной ткани являлись генетически однородной клеточной линией МСК плода; 3 (5,6%) — генетически однородной клеточной линией матери; 3 (5,6%) — МСК матери, контаминированные ДНК клеток плода; 6 (11,1%) — МСК плода, контаминированные ДНК клеток матери. При этом генетически однородные клеточные культуры МСК плода обнаружены в образцах, полученных из комплекса плацентарной ткани, включающей центральную ворсину хориона с прилежащими оболочками плаценты (7 из 11; 63,6%), хориональных ворсинок (1 из 2), хориональной пластинки (13 из 14; 92,9%), амниона (11 из 12; 91,7%) и пупочного канатика (10 из 11; 90,9%). Генетически однородные клеточные культуры МСК матери обнаружены только в половине образцов, полученных из децидуальной ткани (2 из 4), что соответствует анатомической характеристике плаценты.

STR-анализ позволяет выявить генетически гетерогенный состав клеточных культур МСК комплекса плацентарной ткани. Чистые клеточные культуры МСК плода чаще всего выделяли из амниона, хориональной пластинки и пупочного канатика. Чистые клеточные культуры МСК матери выделяли из децидуальной ткани. Наши исследования показали, что смешанные культуры МСК могут выделяться из различных тканей первичного материала плаценты. Таким образом, необходимо проводить генетическую идентификацию культур клеток комплекса плацентарной ткани.

Список литературы

1. Варьясова А.А., Астрелина Т.А., Кобзева И.В., и др. Выделение и биологические характеристики стволовых клеток плаценты // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. 2021. Т. 20, № 5. С. 20–28. EDN: EJUGSR doi: 10.20953/1726-1678-2021-5-20-28
2. Heazlewood C.F., Sherrell H., Ryan J., et al. High incidence of contaminating maternal cell overgrowth in human placental mesenchymal stem/stromal cell cultures: a systematic review // Stem Cells Transl Med. 2014. Vol. 3, N 11. P. 1305–1311. doi: 10.5966/sctm.2014-0051

Бурка И.С.^{1,2} ✉, Маланин Д.А.^{1,2}, Демещенко М.В.^{1,2}, Кондрашенко В.В.¹, Ласков И.Г.¹

Возможности внутрисуставной терапии обогащенной тромбоцитами плазмой при лечении пациентов с терминальной стадией остеоартрита коленного сустава

¹ Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

² Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

✉ dr.ivan.burka@yandex.ru

Аннотация. Выполнено нерандомизированное, проспективное исследование с целью определения эффективности внутрисуставного введения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) у пациентов с терминальной стадией остеоартрита коленного сустава. Установлена эффективность ОТП на протяжении 3 месяцев наблюдения.

Ключевые слова: остеоартрит; остеоартрит коленного сустава; обогащенная тромбоцитами плазма; ОТП; препарат гиалуроновой кислоты.

Burka I.S.^{1,2}, Malanin D.A.^{1,2}, Demeschenko M.V.^{1,2}, Kondrashenko V.V.¹, Laskov I.G.¹

Title possibilities of intra-articular platelet-rich plasma therapy in the treatment of patients with end-stage osteoarthritis of the knee joint

¹ FGBOU VolgSMU Ministry of health of Russia, Volgograd, Russia

² GBU Volgograd Medical Scientific Center, Volgograd, Russia

Abstract. We performed a non-randomized, prospective study to determine the effectiveness of intra-articular administration of platelet-rich plasma (PRP) in patients with end-stage osteoarthritis of the knee joint. The effectiveness of PRP was established over a 3-month follow-up period.

Keywords: osteoarthritis; knee osteoarthritis; platelet rich plasma; PRP; hyaluronic acid.

Остеоартрит является наиболее частой причиной инвалидности среди патологии костно-мышечной системы, при этом около 30% случаев первичной инвалидности приходится на локализацию патологического процесса в коленном суставе [2]. Основная масса таких пациентов с инвалидностью имеет терминальную стадию остеоартрита коленного сустава (ОА КС). Методом выбора при лечении данной группы больных является эндопротезирование. Однако следует учитывать период ожидания операции, а также наличие противопоказаний или отказ пациента от оперативного лечения, в этом случае для улучшения качества жизни требуется продолжение адекватной консервативной терапии. Наряду с лечебной физкультурой, ортезированием, физиотерапией, использованием средств опоры, приемом НПВС и препаратов группы SYSADOA, чтобы добиться удовлетворительного результата, у пациентов с терминальной стадией ОА КС также применяется внутрисуставная терапия обогащенной тромбоцитами плазмой (ОТП) [1]. Несмотря на ряд положительных эффектов, которые реализуются после введения данного ортобиологического продукта в полость сустава: хондропротективный, лубрикативный, антимикробный, — наиболее важным при терапии терминальной стадии ОА является противовоспалительное действие ОТП [3]. В современной научной литературе имеются лишь единичные публикации, посвященные клиническому исследованию данной проблемы [1].

Целью нашей работы являлось определение эффективности внутрисуставного введения ОТП у пациентов с ОА КС 3-й стадии согласно классификации Н.В. Косинской, IV степени по классификации Kellgren-Lawrence.

Нерандомизированное, проспективное исследование было выполнено в условиях «Клиники семейной медицины» ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России. После прохождения физикального, лабораторного и рентгенологического обследования 20 участникам исследования, 4 мужчинам и 16 женщинам, был установлен диагноз ОА КС 3-й стадии Н.В. Косинской, IV степени по Kellgren–Lawrence. Средняя продолжительность заболевания у исследуемых пациентов составила $9,5 \pm 2,9$ года. По 10 человек вошли в состав каждой из исследуемых групп, средний возраст участников в основной группе составил $68,4 \pm 5,3$ года, в группе сравнения — $70,9 \pm 6,4$ года. Пациентам основной группы выполнялись 3 внутрисуставные инъекции ОТП в объеме 2 мл с периодичностью 1 раз в неделю. В группе контроля пациентам еженедельно трехкратно выполнялось внутрисуставное введение препарата гиалуроновой кислоты (пГК) с молекулярной массой $3,5 \times 10^6$ Da — 1,6% объемом 2 мл. Исходы лечения оценивались по данным ВАШ и шкалы WOMAC 3.1 LK, период наблюдения составил 12 месяцев.

Наиболее значимого уменьшения уровня альгофункциональных показателей по шкале WOMAC удалось достичь спустя 1 месяц после первой внутрисуставной инъекции как в основной группе: с $55,3 \pm 8,2$ до $30,2 \pm 5,5$, так и в группе сравнения: с $48,1 \pm 7,6$ до $38,6 \pm 5,8$. Также в этой контрольной точке удалось достичь наименьшего уровня болевого синдрома согласно ВАШ: у получавших ОТП пациентов с $8,8 \pm 0,8$ до $5,2 \pm 0,8$, а в группе пГК с $7,6 \pm 0,9$ до $6,3 \pm 0,7$. Отрицательная динамика после выполнения серии внутрисуставных инъекций ОТП была выявлена через 3 месяца наблюдения: WOMAC $45,8 \pm 6,8$, ВАШ $7,6 \pm 0,9$, через 6 месяцев альгофункциональные показатели были аналогичны изначальным значениям: WOMAC $53,4 \pm 7,9$, ВАШ $8,4 \pm 1,0$, что сохранилось и через 12 месяцев: WOMAC $55,1 \pm 8,9$, ВАШ $8,7 \pm 1,3$. У пациентов, которым была выполнена вискоапплементарная терапия пГК, уже через 3 месяца после начала лечения значения шкал соответствовали исходным: WOMAC $43,4 \pm 6,5$, ВАШ $7,4 \pm 0,9$, значительных изменений не последовало и через 6 месяцев: WOMAC $46,4 \pm 7,3$, ВАШ $7,8 \pm 1,1$, и через 12 месяцев: WOMAC $47,2 \pm 7,7$, ВАШ $7,8 \pm 1,2$.

По результатам исследования мы пришли к следующим выводам: внутрисуставное введение ОТП может уменьшить проявление основных симптомов заболевания у пациентов с терминальной стадией ОА КС на срок до 3 месяцев; наилучших альгофункциональных результатов при использовании ОТП следует ожидать в течение 1-го месяца после начала процедур; ОТП превосходит по эффективности и длительности действия пГК; повторный курс внутрисуставной терапии ОТП может быть проведен через 3 месяца в случае, если оперативное вмешательство у пациента не запланировано в течение последующих 6 месяцев с момента крайней процедуры.

Список литературы

1. Saraf A., Hussain A., Bishnoi S., et al. Platelet-rich plasma intra-articular injections in Kellgren and Lawrence grade IV knee joint osteoarthritis: a prospective blinded placebo-controlled interventional study // Indian J Orthop. 2022. Vol. 56, N 10. P. 1722–1728. doi: 10.1007/s43465-022-00730-4
2. Петрунько И.Л., Меньшикова Л.В., Сергеева Н.В., Черкасова А.А. Нозологическая структура инвалидности при остеоартрите в Иркутской области // Научно-практическая ревматология. — 2018. Т. 56, № 2. С. 202–207. EDN: UQTVVY doi: 10.14412/1995-4484-2018-202-207
3. Маланин Д.А., Страхов М.А., Бурка И.С., и др. Остеоартрит. В кн.: Маланин Д.А., Трегубов А.С., Демещенко Д.В., Черезов Л.Л. PRP-терапия: обоснованные решения для клинической практики. Москва: Перо, 2023. С. 9–39.

Бурьянская Е.Л., Градов О.В. ✉, Градова М.А., Маклакова И.А.

Мультифрактальные характеристики потенциальных скаффолдов: взгляд с позиций регенеративной медицины

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ o.v.gradov@gmail.com

Аннотация. Необходимость исследования фрактальных параметров потенциальных скаффолдов, с точки зрения регенеративной биомедицины, сопряжена с различием эффективности регенерации, в зависимости от развитости поверхности, номенклатуры диапазонов размеров пор и толщины волокон (оптимизируемых по критериям распластывания и адгезии клеток к поверхности), различной эффективностью прорастания филоподий и протрузий клеток в скаффолд в ходе регенерации, в зависимости от характерных размеров его пор и перколяционных параметров.

Ключевые слова: ПГБ; ПЛА; ПВДФ; мультифрактальные спектры; 2D FFT.

Buryanskaya E.L., Gradov O.V., Gradova M.A., Maklakova I.A.

Multifractal parameters of potential scaffolds from the standpoint of regenerative biomedicine of the future

FRC CP RAS, Moscow, Russia

Abstract. The need to study the (multi-)fractal parameters of potential scaffolds, from the point of view of regenerative biomedicine, is associated with differences in the regeneration efficiency, depending on the surface development, the range of pore sizes and fiber thickness (optimized in accordance with the criteria of the cell spreading and adhesion to the surface), and different efficiencies of the cell filopodia and protrusion outgrowth into the scaffold during regeneration, depending on the characteristic sizes of its pores and percolation parameters.

Keywords: PLA; PHB; PVDF; multifractal spectra; 2D FFT.

В настоящее время имеется достаточно много работ по дизайну фрактальных скаффолдов и фрактальной характеристике скаффолдов от морфогенеза капилляров до нейроморфогенеза и создания искусственных нейронных сетей [1–5], поэтому предлагаемый нами подход с динамическим электронно-микроскопическим анализом (SEM и ESEM) подобных структур и времяразрешенной характеристикой их мультифрактальных свойств является обоснованным. В принятой в печать (Springer) нашей работе (с подзаголовком “Towards Electric-Field- and Electron-Beam-Controllable Scaffolds and Tissue-Engineering Constructs with Dynamic Beads”) предлагается использовать технологию BCMSPSC (box counting for multi-scale porous scaffold characterization), что является частью мультифрактальной обработки и мультифрактального анализа изображений. Поэтому мы обращаемся не к банальному построению экспонент Херста и размерности Хаусдорфа, а к мультифрактальной методике, способствующей работе в области многоуровневого анализа структуры материала в большей степени.

Фрактальные свойства биodeградируемых, биорезорбируемых (и биологическими, и физико-химическими вторичными факторами) структур на базе микроволокон электроформованных сегнетоэлектрических полимеров, используемых для разработки активных скаффолдов, были неоднократно исследованы за последние десятилетия. Однако до второй половины 2010-х гг. применения данного фрактального метода в биологических исследованиях с использованием активных волокон сводились к анализу биodeградации или почвенной деградации полимера, а также биоразлагаемых композитных материалов на его основе,

без привязки к внедрению в регенеративной медицине в контакте с живым организмом *in vivo* или *in situ*, не говоря уже о клиническом или преклиническом исследовании.

В то же время, следует отметить, что создание функционально-градиентных структур на базе соответствующих биосовместимых полимеров (типа ПЛА, ПГБ, ПВДФ) известно со второй половины 2000-х гг. В частности, работы по созданию и фрактальным исследованиям ПЛА-волоконных скаффолдов для тканевой инженерии публиковались в изданиях Beijing University of Chemical Technology в 2006 г. (к сожалению, ограничение аппарата цитирования в тезисах не даёт нам в полной мере процитировать необходимую литературу по данному вопросу).

В исследованиях, проведенных в Отделе Динамики Химических и Биологических Процессов ФИЦ ХФ РАН в прошлые годы, было показано, что мультифрактальные дескрипторы таких волоконных скаффолдов, регистрируемые методами времяразрешенной/стробоскопической электронной микроскопии, могут осциллировать во времени, а также испытывать гистерезис с различными путями релаксации/восстановления исходного состояния. Это характерно для разных волокон ПЛА, ПГБ, ПВДФ в разной степени. Мультифрактальные спектры подобных волокон существенно варьируются, завися от метода электроформования (электроспиннинг). Динамическая пористость, выявляемая путём времяразрешенной дифрактометрии и 2D FFT-анализа (корреляционно-спектрального анализа), также существенно варьируется, причём в ходе стимуляции, направленного роста/регенерации ткани интегральные пространственные характеристики изменяются в большей степени наглядно, чем усредняющие по размерам пор или волокон интегральные частотные характеристики.

Список литературы

1. Warner J., Soman P., Zhu W., et al. Design and 3D printing of hydrogel scaffolds with fractal geometries // ACS Biomater Sci Eng. 2016. Vol. 2, N 10. P. 1763–1770. doi: 10.1021/acsbomaterials.6b00140
2. Spaletta G., Della Casa C., Bodria M., et al. A fractal model for bioengineering of the stromal/vascular scaffold of a bionic human thyroid gland // Ital J Anat Embryol. 2006. Vol. 111. ID 75.
3. Derimay F., Souteyrand G., Motreff P., et al. Sequential proximal optimizing technique in provisional bifurcation stenting with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffold: fractal coronary bifurcation bench for comparative test between absorb and XIENCE Xpedition // JACC: Cardiovasc Interv. 2016. Vol. 9, N 13. P. 1397–1406. doi: 10.1016/j.jcin.2016.04.021
4. Van Kampen K., Mota C., Moroni L. Mechanical stimulation of fractal based scaffolds to steer stem cell activity // Tissue Eng Part A. 2022. Vol. 28. P. S47–S48.
5. Guarino V., Guaccio A., Netti P.A., Ambrosio L. Image processing and fractal box counting: user-assisted method for multi-scale porous scaffold characterization // J Mater Sci: Mater Med. 2010. Vol. 21, N 12. P. 3109–3118. doi: 10.1007/s10856-010-4163-9

Бутузова Д.А.✉, Кулебякина М.А., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.

Идентификация белковых партнеров и субстратов ферментативной активности белка FAPα в активированных фибробластах методом протеомного анализа

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Медицинский научно-образовательный институт, Москва, Россия

✉ da.butuzova@gmail.com

Аннотация. Белок активации фибробластов (FAPα), или сепраза, является важным участником развития и прогрессирования фиброза. В данной работе методом протеомного анализа нами выявлены потенциальные партнеры FAPα, а также возможные субстраты ферментативной активности данного белка в стромальных клетках человека.

Ключевые слова: фиброз; фибробласты; белок активации фибробластов; протеомный анализ; ферментативная активность; внеклеточный матрикс; белок-белковые взаимодействия.

Butuzova D.A., Kulebyakina M.A., Basalova N.A., Efimenko A.Yu.

Identification of protein partners and substrates of FAPα protein enzymatic activity in activated fibroblasts by proteomic analysis

Lomonosov Moscow State University, Medical Research and Educational Institute, Moscow, Russia

Abstract. Fibroblast activation protein (FAPα), or seprase, is believed to contribute to the development and progression of fibrosis. In this work, we identified potential partners of this protein and possible FAPα enzymatic activity substrates in human stromal cells by proteomic analysis.

Keywords: fibrosis; fibroblasts; fibroblast activation protein; proteomics; enzymatic activity; extracellular matrix; protein-protein interactions.

Частым исходом заживления поврежденной ткани является развитие фиброза, которое может привести к утрате функции ткани или органа. Основными эффекторными клетками при развитии и прогрессии фиброза являются миофибробласты и их предшественники — т.н. активированные фибробласты, образующиеся из резидентных фибробластов под действием профибротических стимулов. Характерным признаком этих клеток является появление на их мембране белка активации фибробластов (Fibroblast Activation Protein, FAPα), трансмембранной сериновой протеазы. Согласно последним данным, FAPα является не только маркером, но и молекулой, важной для функционирования данных клеток — как за счет ферментативной активности, так и по механизмам, не связанным с ферментативной активностью FAPα [1, 2]. Однако роль FAPα в функционировании активированных фибробластов при развитии фиброза не установлена.

В данной работе мы провели поиск потенциальных белковых партнеров FAPα, а также субстратов ферментативной активности FAPα в активированных фибробластах, которые получали, инкубируя первичные фибробласты кожи человека в присутствии TGF-β в течение 24 ч. Полученные клетки лизировали и из лизатов проводили коиммунопреципитацию с антителами, специфическими к FAPα (либо с контрольными изотипическими иммуноглобулинами). Белки в составе элюатов, полученных после иммунопреципитации, разделяли методом электрофореза по Лэммли, готовили из них пептиды методом трипсинолиза в геле. Хромато-масс-спектрометрический анализ пептидов проводили на базе ЦКП ИБХ РАН на приборах Ultimate 3000RSLCnano и Q Exactive Plus. Первичные данные обрабатывали, используя ПО MaxQuant и Perseus.

Полученный список белков, специфически копреципитированных с FAP α , анализировали с использованием сервиса g:Profiler, также с помощью базы данных STRING строили сеть белок-белковых взаимодействий. Для поиска возможных субстратов ферментативной активности FAP α первичные последовательности идентифицированных белков анализировали на предмет наличия специфических сайтов расщепления FAP α .

Нами были обнаружены 222 белка, копреципитированных с FAP α , из которых 143 белка аннотированы в базе данных Gene Ontology как локализующиеся во внеклеточном пространстве или внеклеточном матриксе (ВКМ). Анализ обогащения по функциональной принадлежности показал, что данный список обогащен пептидазами (такие как ADAM12, ADAM9, DPP-4) и ингибиторами протеаз (например, TIMP-1, PAI-1, PAI-2), факторами роста (среди них CSF1, ингибин B, неудезин), белками, участвующими в клеточной адгезии (такие как OB-кадгерин, T-кадгерин, альфа-парвин), белками, связывающимися с цитоскелетом (CDM, кофилин-1, профилин-1 и др), белками, связывающимися с ВКМ (среди которых SPARC, периостин, коллаген 11 типа альфа-1). Также были обнаружены белки, взаимодействующие с сигнальными путями TGF- β (SPARC, периостин, PAI-1) и VEGF (такие как VEGFA, кальциневрин А альфа, HspB1).

Помимо этого, для всех обнаруженных нами белков, копреципитированных с FAP α , мы проанализировали сеть белок-белковых взаимодействий. Для шести белков (люмикан, периостин, кадгерин-11, коллаген 11 типа альфа-1, S100-A4, DPP-4) в базе данных STRING нами обнаружены свидетельства их взаимодействия с FAP α , что делает данные белки наиболее вероятными непосредственными партнерами FAP α . Гены белков с наибольшим числом взаимодействий (hub genes) определяли с использованием ПО Cytoscape (плагин cytoHubba, алгоритм maximal clique centrality (MCC)). Среди 30 генов таких белков можно выделить три функциональные группы: структурные компоненты ВКМ (8 генов), белки, связывающие актиновые филаменты (6 генов), белки, связывающие убиквитин либо убиквитинлигазу (8 генов).

Для поиска субстратов ферментативной активности FAP α первичные последовательности белков, обнаруженных в нашей работе как копреципитированных с FAP α , анализировали на предмет наличия сайтов расщепления FAP α (GP, PPGP и (D/E)-(R/K)-G-(E/D)-(T/S)-GP [3]). Последовательность GP обнаружена у 146 белков, 103 из которых могут быть секретлируемыми. Последовательности (D/E)-(R/K)-G-(E/D)-(T/S)-GP не обнаружены ни у одного белка. Последовательность PPGP, подверженная расщеплению FAP α , обнаружена в четырёх белках (коллаген 11 типа альфа-1, коллаген 4 типа альфа-2, GSTO-1, связывающий танкиразу-1 белок-1). Данные белки можно рассматривать как наиболее вероятные субстраты эндопептидазной активности FAP α в активированных фибробластах.

Таким образом, в данной работе мы выявили потенциальные партнеры белка FAP α , а также возможные субстраты его эндопептидазной активности в стромальных клетках человека. Проверка взаимодействия данных белков с FAP α будет являться задачей дальнейших исследований. Полученные данные помогут выяснить роль FAP α в регуляции функций активированных фибробластов при развитии фиброза, а также, возможно, позволит определить новые мишени для терапии фибротических заболеваний.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>.

Список литературы

1. Basalova N., Alexandrushkina N., Grigorieva O., et al. Fibroblast activation protein Alpha (FAP α) in fibrosis: Beyond a perspective marker for activated stromal cells? // *Biomolecules*. 2023. Vol. 13, N 12. ID 1718. doi: 10.3390/biom13121718
2. Cao F., Wang S., Wang H., Tang W. Fibroblast activation protein- α in tumor cells promotes colorectal cancer angiogenesis via the Akt and ERK signaling pathways // *Mol Med Rep*. 2018. Vol. 17, N 2. P. 2593–2599. doi: 10.3892/mmr.2017.8155
3. Aggarwal S., Brennen W.N., Kole T.P., et al. Fibroblast activation protein peptide substrates identified from human collagen I derived gelatin cleavage sites // *Biochemistry*. 2008. Vol. 47, N 3. P. 1076–1086. doi: 10.1021/bi701921b

Вавилова Ю.Д.¹ ✉, Величинский Р.А.¹, Юсубалиева Г.М.², Стрельцова М.А.¹, Коваленко Е.И.¹

Получение CAR-UCB-NK-клеток, направленных на простатспецифический мембранный антиген PSCA

¹ Государственный научный центр Российской Федерации институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия

✉ juliateterina12@gmail.com

Аннотация. Получение CAR-NK-клеток против солидных опухолей — активно развивающееся направление в персонализированной терапии. В этой работе мы получили генномодифицированные NK-клетки пуповинной крови, специфические к антигену стволовых клеток простаты (PSCA) и охарактеризовали их цитотоксические свойства.

Ключевые слова: генномодифицированные NK-клетки; химерный антигенный рецептор; CAR; PSCA; солидные опухоли.

Vavilova J.D.¹, Velichinskii R.A.¹, Yusubalieva G.M.², Streltsova M.A.¹, Kovalenko E.I.¹

Generation of CAR-UCB-NK cells targeting prostate-specific membrane antigen PSCA

¹ Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Obtaining CAR-NK cells against solid tumors is an actively developing direction in personalized therapy. In this work, we obtained genetically modified umbilical cord blood NK cells specific to the prostate stem cell antigen (PSCA) and characterized their cytotoxic properties.

Keywords: genetically modified NK cells; chimeric antigen receptor; CAR; PSCA; solid tumors.

Получение CAR-NK-клеток для борьбы с солидными опухолями — активно развивающееся направление в персонализированной клеточной терапии, в том числе солидных опухолей. NK-клетки имеют ряд преимуществ по сравнению с Т-лимфоцитами из-за возможности использования аллогенных эффекторов и меньшего риска развития реакции «трансплантат против хозяина», цитокинового шторма и нейротоксичности. Преимуществом использования NK-клеток пуповинной крови (UCB-NK) является то, что UCB-NK-клетки менее зрелые и обладают большим пролиферативным потенциалом, более интенсивно секретируют IFN- γ по сравнению с периферическими NK-клетками. В этой работе мы получили специфические к антигену стволовых клеток простаты (PSCA) первичные UCB-NK-клетки, путем трансдукции гена химерного PSCA-специфического рецептора (PSCA-CAR) в UCB-NK-клетки. Для доставки гена, кодирующего PSCA-CAR в UCB-NK-клетки человека, использовался ретровирусный вектор, псевдотипированный оболочечным белком эндогенного ретровируса RD114. UCB-NK-клетки были предварительно активированы сочетанным стимулом в виде растворимого IL-2 и облученных фидерных клеток K562-mbIL21, экспрессирующих мембраносвязанный IL-21. Эффективность трансдукции UCB-NK-клеток достигала 23%. Была оценена цитотоксическая активность модифицированных PSCA-CAR UCB-NK-клеток в отношении клеток-мишеней (линия K562) по уровню поверхностной экспрессии лизосомального маркера LAMP-1 (CD107a). По результатам проведенных тестов было показано, что уровень цитотоксической активности GFP+ UCB-NK-клеток в 2 раза превосходит цитотоксическую активность активированных UCB-NK-клеток (средние значения — 60% и 25% CD107a-позитивных клеток соответственно). Таким образом, повышенная цитотоксическая активность

CAR-модифицированных UCSB-NK-клеток в отношении раковых клеток-мишеней открывает перспективное направление для дальнейшего их исследования, а именно для более детального изучения функциональных способностей CAR-модифицированных UCSB-NK-клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №24-75-00160).

Виговский М.А. ✉, Басалова Н.А., Дьячкова У.Д., Попов В.С., Толстолужинская А.Е., Григорьева О.А., Ефименко А.Ю.

Роль клеточного старения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток в развитии фиброза

Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ vigovskiy_m.a@mail.ru

Аннотация. Изменение микроокружения, вызванное развитием фиброза, запускает клеточное старение МСК, что приводит к снижению антифибротического действия секретируемых ими внеклеточных везикул. Этот эффект значимо проявляется при введении старым, но не молодым мышам с блеомицин-индуцированным фиброзом легких.

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

Vigovskii M., Basalova N., Dyachkova U., Popov V., Tolstoluzhinskaya A., Grigorieva O., Efimenko A.

The role of cellular senescence of multipotent mesenchymal stromal cells in the development of fibrosis

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The change in the microenvironment caused by fibrosis development induces cellular senescence of MSCs, which leads to a decrease in antifibrotic effect of extracellular vesicles. This effect is significant when EVs are administered to old, but not young mice with bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Keywords: pulmonary fibrosis; mesenchymal stromal cells; secretome; extracellular vesicles; induced senescence; aging.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются хорошо известными регуляторами процессов регенерации и репарации поврежденных тканей. Во многих исследованиях показана способность молекул, переносимых в составе внеклеточных везикул секретомы МСК (ВВ), предотвращать развитие фиброза в исходе повреждения тканей. Однако специфическое микроокружение в патологически измененных тканях может влиять на секреторную активность МСК. Ранее мы показали, что профибротическое микроокружение вызывает клеточное старение МСК. В этом исследовании мы проанализировали антифибротический потенциал ВВ сенесцентных МСК, накапливающихся при культивировании в профибротических условиях (пфМСК), на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Внеклеточный матрикс дермальных фибробластов и TGF β использовались для моделирования профибротических условий [1]. Фракция ВВ была выделена с помощью ультрафильтрации из секретомы МСК жировой ткани человека. Для модели фиброза *in vitro* использовали индуцированную TGF β дифференцировку фибробластов в миофибробласты, эффективность дифференцировки оценивали по уровню экспрессии α SMA с использованием вестерн-блота и ИЦХ. Фиброз легких *in vivo* был вызван у мышей (возрастом 4–6 и 20–24 недели) путем интратрахеального введения блеомицина; через 14 дней ВВ МСК или ВВ пфМСК были введены интратрахеально однократно. Выраженность фиброза легких оценивали с помощью МРТ и гистологического анализа тканей легких; процент клеток Lin⁺ в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) анализировали с помощью проточной цитометрии.

В модели фиброза *in vitro* мы обнаружили 2–2,5-кратное снижение способности ВВ пфМСК подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты по сравнению с ВВ контрольных МСК. *In vivo* мы показали,

что у молодых мышей восстановление нормальной легочной ткани происходит как при введении ВВ МСК, так и ВВ пфМСК (хотя для ВВ пфМСК наблюдается тенденция к снижению эффективности). У старых мышей терапия ВВ МСК способствовала восстановлению функциональной ткани, в то время как ВВ пфМСК были значительно менее эффективны. Мы обнаружили значительное увеличение базального уровня Lin⁺ клеток в БАЛ старых мышей и в той же группе выявили тенденцию к снижению количества Lin⁺ после инъекции ВВ МСК, но не ВВ пфМСК.

Таким образом, индуцированное профибротическим микроокружением старение МСК приводит к снижению антифибротического потенциала этих клеток, опосредованного продукцией ВВ в составе секрета. Однако *in vivo* это функциональное ухудшение реализуется только у старых, но не у молодых животных с фиброзом легких.

Исследование поддержано РФФИ, грант № 19-29-04172 (клеточные культуры, животная модель) и РНФ, грант № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/> (гистология).

Список литературы

1. Grigorieva O., Basalova N., Dyachkova U., et al. Modeling the profibrotic microenvironment in vitro: Model validation // Biochem Biophys Res Commun. 2024. Vol. 733. ID 150574. doi: 10.1016/j.bbrc.2024

Власова И.И.¹ ✉, Ефремов Ю.М.¹, Сулейманов Ш.К.¹, Урмантаева Н.Т.¹, Якимов Б.П.^{1,2},
Ширшин Е.А.^{1,2}, Тимашев П.С.^{1,3,4}

Редокс-регуляция взаимодействия скаффолдов с фагоцитами в процессе регенерации ткани

¹ Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

³ Центр мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

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

✉ vlasova_i_i@staff.sechenov.ru

Аннотация. Редокс-активация нейтрофилов и макрофагов в области имплантации скаффолдов в фазе острого воспаления приводит к окислительной модификации материалов, что в дальнейшем будет влиять на активацию и поляризацию макрофагов.

Ключевые слова: воспаление; активные формы кислорода; нейтрофилы; макрофаги; хлорноватистая кислота; перикард.

Vlasova I.I.¹, Efremov Y.M.¹, Suleimanov S.K.¹, Urmantaeva N.T.¹, Yakimov B.P.^{1,2},
Shirshin E.A.^{1,2}, Timashev P.S.^{1,3,4}

Redox regulation of phagocyte/scaffold interactions in tissue regeneration

¹ Institute for Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

² Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Redox activation of neutrophils and macrophages at the site of scaffold implantation during the acute inflammation phase causes the oxidative modification of materials, which will further affect the macrophage activation and polarization.

Keywords: inflammation; scaffolds; reactive oxygen species; neutrophils; macrophages; hypochlorous acid; pericardium.

Нейтрофилы и макрофаги в про-воспалительном M1 состоянии — основные участники острой стадии воспаления, которая возникает в ответ на имплантацию материалов. Активация фагоцитов необходима не только для борьбы с инфекцией, но и для подготовки тканей к регенерации и для согласования действий других клеток — участников воспаления. Основные исследования по изучению иммунного ответа на имплантацию биоматериалов сосредоточены на поляризации макрофагов из про-воспалительного M1 состояния в репаративное M2 состояние. Активации нейтрофилов, как и в целом радикал-генерирующей активности фагоцитов и развитию окислительного стресса, уделяется незаслуженно мало внимания.

Нейтрофилы — клетки, которые первыми рекрутируются в место повреждения и активируются. Используя различные материалы — коллаген, скаффолды на основе перикарда, полилактида и шелка,

мы показали, что материалы активируют нейтрофилы в цельной крови. Кроме коллагена, все остальные скаффолды в разной степени активируют продукцию внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), вызывают секрецию миелопероксидазы (МПО), усиливают генерацию АФК во внеклеточное пространство, а также стимулируют образование нейтрофильных внеклеточных ловушек [1]. Основным источником АФК активированных нейтрофилов и макрофагов — NADPH оксидаза, которая продуцирует супероксид анион, дисмутирующий в пероксид водорода. В присутствии H_2O_2 уникальный фермент нейтрофилов МПО продуцирует хлорноватистую кислоту (HOCl) — сильнейший окислитель, способный модифицировать как ткани хозяина, так и биоматериалы. На примере децеллюляризованного бычьего перикарда (коллаген I типа), структурированного генипином (ДБПГ), мы показали, что HOCl окисляет поверхность материала, что приводит к уменьшению модуля Юнга, измеренного с помощью атомной силовой микроскопии (АСМ), и к изменению параметров затухания флуоресценции материала, что показано с использованием метода флуоресцентной время-разрешенной микроскопии (FLIM). Степень деградации материала зависела от концентрации добавленного гипохлорита в области физиологически значимых значений HOCl, параметры затухания флуоресценции обработанного гипохлоритом ДБПГ хорошо коррелировали с изменениями микромеханических свойств материала [2]. Получены значимые изменения времени затухания флуоресценции ДБПГ после его инкубации с активированными нейтрофилами, которые не удавалось зарегистрировать, если в среду инкубации был добавлен перехватчик гипохлорита метионин.

Скаффолды на основе биоматериалов представляют собой углеродсодержащие структуры с множественными связями C-C и C-H, которые уязвимы для окислительных модификаций и процесса деградации. В то же время синтетические материалы были более устойчивы к модификации поверхности при их обработке гипохлоритом.

Окислительная модификация скаффолда HOCl, продуцируемой МПО, меняет структуру материала и может являться фактором, определяющим дальнейший ответ иммунной системы. Обработанный гипохлоритом ДБПГ усиливал продукцию про-воспалительного цитокина TNF- α как M1, так и M0 макрофагами. Макрофаги являются не только исполнителями, но и дирижерами воспалительных процессов, поэтому изменение секреции цитокинов этими клетками может существенно повлиять на формирование адаптивного иммунного ответа и на регенерацию тканей. Понимание механизмов активации фагоцитов скаффолдами и степени редокс-модификации материалов имеет большое значение для поиска подходов к регуляции иммунного ответа и регенерации тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-25-00497.

Список литературы

1. Vlasova I.I., Suleimanov S.K., Mikhalechik E.V., et al. Redox-activation of neutrophils induced by pericardium scaffolds // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 24. ID 15468. doi: 10.3390/ijms232415468
2. Yakimov B.P., Vlasova I.I., Efremov Y.M., et al. Detection of HOCl-driven degradation of the pericardium scaffolds by label-free multiphoton fluorescence lifetime imaging // *Sci Rep*. 2022. Vol. 12, N 1. ID 10329. doi: 10.1038/s41598-022-14138-5

Власова Т.И., Бродовская Е.П. ✉, Мадонов К.С., Хуторская И.А., Лошкарёва А.И.

Оптимизация протокола для изучения влияния обогащённой тромбоцитами плазмы на культуру дермальных фибробластов

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

✉ ekbrodovskaya@gmail.com

Аннотация. Изучено влияние обогащенной тромбоцитами плазмы на культуру фибробластов кожи человека (метаболическая и миграционная активность) в различных условиях. Оптимум для оценки параметров выявлен при плотности посадки 2,5–5,0 тыс. клеток, концентрации PRP в среде 5–10%, срок — 72 часа эксперимента.

Ключевые слова: регенеративная медицина; хирургия; заживление ран; обогащенная тромбоцитами плазма; стандартизация.

Vlasova T.I., Brodovskaya E.P., Madonov K.S., Hutorskaya I.A., Loshkareva A.I.

Optimization of the protocol for studying effects of platelet-rich plasma on dermal fibroblast culture

National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia

Abstract. The authors explore *in vitro* the effect of platelet-rich plasma on the human skin fibroblast culture (metabolic and migration activity) under various conditions: the optimal ones are cell density of 2,5–5,0 thousand cells, culture medium PRP concentration of 5–10% at the 72 hour of the experiment.

Keywords: regenerative medicine; surgery; wound healing; platelet-rich plasma; standardization.

Регенерация тканей является одной из актуальных проблем хирургии, особенно при патологии челюстно-лицевой области, исход которой требует отсутствия как функциональных, так и косметических дефектов. В настоящее время ведется поиск новых и совершенствование старых подходов к управлению процессом заживления, одним из которых является применение обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP). Давно известный и широко распространенный данный метод, тем не менее, имеет ограничения и спорные аспекты. Традиционно PRP применяется непосредственно после изготовления, при этом ведутся поиски способов хранения препарата без утраты его эффективности. Другим неоднозначным вопросом PRP-терапии является выбор способа активации тромбоцитов перед применением: химические активаторы (CaCl₂, тромбин, коллаген, др.), физические методы (цикл «замораживание–размораживание», ультразвук и др.). Некоторые исследователи вовсе ставят под сомнение необходимость активации. Также PRP-терапия отличается низкой стандартизацией и значительным разнообразием протоколов, и этот же недостаток присущ и разработкам в данной области. Поэтому существует потребность как в исследованиях, направленных на преодоление ограничений метода, прояснение его спорных аспектов, в стандартизации методики. Целью исследования было изучение *in vitro* влияния PRP на культуру фибробластов кожи человека (ФКЧ) в зависимости от плотности посадки клеток, способа активации и концентрации PRP. Исследование проводили с использованием крови четырех здоровых доноров, давших добровольное согласие. Проводили контроль показателей цельной крови. PRP готовили методом одноэтапного центрифугирования (ELMI Centrifuge CM-6MT, ротор 6M.02; 270 g, 7 мин., 22°C) [1]. После фракционирования цельной крови отбирали 1 мл PRP (средняя концентрация тромбоцитов: 613,2±125,2 на 1 мкл) и хранили в пробирках типа Eppendorf до 1 мес. при –20°C [2]. В исследовании использовали клеточную линию hTERT-HDFa (d220) иммортализованных фибробластов кожи человека

(УНУ «Коллекция клеточных культур» ИБР РАН). Плотность посадки клеток для 96-луночного планшета для исследования метаболической активности: 2500–10000/лунка. Клетки культивировали на среде DMEM в стандартных условиях: 37°C и 5% CO₂. В опытные лунки вносили PRP в концентрациях 2,5%, 5% и 10%. Отрицательный контроль — среда без PRP. Положительный контроль — среда с 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS). Активировали PRP посредством: 1) цикла «замораживание-размораживание»; 2) сочетанием первого способа с последующим добавлением к PRP 10% CaCl₂ (20 мкл/мл) [3] и центрифугированием (EBA 21 Hettich, 4000 g, 10 мин.) для отделения фибринового сгустка. Оценивали метаболическую активность и жизнеспособность ФКЧ с помощью МТТ-тест через 24, 48 и 72 часа эксперимента; пролиферацию и миграцию ФКЧ — scratch assay с оценкой закрытия дефекта через 0, 24 и 48 часа инкубации в 24-луночном планшете с плотностью клеток 25 тыс./лунка [4]. Статистическую обработку данных проводили в программе StatTech v. 4.1.7; различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования показали, что метаболическая активность и жизнеспособность ФКЧ зависят от плотности посадки клеток, концентрации PRP в среде и длительности эксперимента. Было выявлено, что оптимальные показатели жизнеспособности отмечались при концентрации 2,5–5,0 тыс. клеток на лунку и внесении 5–10% PRP в среду. При повышении плотности засева образовывались скопления клеток, что может повлиять на интерпретацию результатов. Снижение концентрации PRP до 2,5% менее эффективно влияло на метаболическую активность ФКЧ. Отмечалось снижение метаболической активности и жизнеспособности ФКЧ в первые сутки эксперимента, что может быть связано с продуктами деградации тромбоцитов и адаптацией к биологически активным веществам и цитокинам, что впоследствии приводит к нормализации и повышению метаболической активности через 72 часа. Не отмечено существенного влияния способа активации PRP на метаболическую активность ФКЧ, однако второй способ найден более оптимальным для исследований *in vitro*. Результаты scratch assay показали, что добавление PRP в среду в концентрации 5–10% улучшает миграцию фибробластов (практически полное закрытие дефекта в монослое ФКЧ через 48 часов инкубации). Таким образом, значимые биологические эффекты PRP отмечаются при концентрациях не менее 5% в среде и при 72-часовом периоде наблюдения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00278, <https://rscf.ru/project/24-25-00278/>.

Список литературы

1. Alves R., Grimalt R. A review of platelet-rich plasma: History, biology, mechanism of action, and classification // *Skin Appendage Disord.* 2018. Vol. 4, N 1. P. 18–24. doi: 10.1159/000477353
2. Beitia M., Delgado D., Mercader J., et al. The effect of short-term cryopreservation on the properties and functionality of platelet-rich plasma // *Platelets.* 2023. Vol. 34, N 1. ID 2210243. doi: 10.1080/09537104.2023.2210243
3. Arora G., Arora S. Platelet-rich plasma-Where do we stand today? A critical narrative review and analysis // *Dermatol Ther.* 2021. Vol. 34, N 1. ID e14343. doi: 10.1111/dth.14343
4. Suarez-Arnedo A., Torres Figueroa F., Clavijo C., et al. An image J plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays // *PLoS One.* 2020. Vol. 15, N 7. ID e0232565. doi: 10.1371/journal.pone.0232565
5. McGahon A.J., Martin S.J., Bissonnette R.P., et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro // *Methods Cell Biol.* 1995. Vol. 46. P. 153–185. doi: 10.1016/s0091-679x(08)61929-9

Водякова М.А.✉, Покровский Н.С., Мельникова Е.В.

Аспекты применения проточной цитометрии в оценке качества CAR-T препаратов

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия

✉ vod-marina@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена аналитической оценке CAR-T препаратов, необходимой для установления их подлинности, активности, чистоты и жизнеспособности, методом проточной цитометрии. В ней рассмотрены методы анализа, даны рекомендации по использованию этого метода в оценке качества CAR-T клеток, аспекты валидации и ревалидации.

Ключевые слова: проточная цитометрия; CAR-T; оценка качества; клеточные препараты.

Vodyakova M.A., Pokrovsky N.S., Melnikova E.V.

Aspects of using flow cytometry in CAR-T products quality assessment

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract. The work is devoted to the analytical evaluation of CAR-T products, necessary to establish their identity, quality, purity, and viability with flow cytometry. It discusses analytical methods, provides tips for assessing the quality of CAR-T cells, and covers aspects of validation and revalidation.

Keywords: flow cytometry; CAR-T; quality assessment; cell products.

Аналитическая оценка CAR-T препаратов является критически важной для установления их подлинности, качества, чистоты и жизнеспособности. Разработка методов анализа должна начинаться с ранних стадий создания CAR-T клеток. Рекомендуется использовать разнообразные методы для комплексной характеристики препарата. При этом следует применять фармакопейные методы там, где это возможно, чтобы обеспечить научную обоснованность и стандартизацию процесса [1].

Метод проточной цитометрии позволяет проводить измерение множества характеристик CAR-T препаратов в рамках производственного процесса, например жизнеспособность, подлинность, активность. Описание анализа, включая панель антител для проточного цитометра и стратегию гейтирования, следует проводить для каждой обнаруженной популяции клеток в образце. Также рекомендуется предоставить краткую сводку с информацией о том, как проводилась калибровка прибора, мероприятия по контролю качества (использованные частицы, частота проведения калибровок) для обеспечения правильности полученных результатов.

В рамках разработки методики анализа должны быть разработаны СОП, регулирующие надлежащее выполнение таких процедур, как окрашивание образцов, сбор и анализ данных. Также рекомендуется проводить титрование антител для определения их оптимального разведения. Прямое определение CAR на поверхности клеток может быть использовано для установления доли CAR-положительных (CAR+) клеток. Если CAR определяются методом суррогатной экспрессии белка или другим неспецифичным реагентом, необходимо оценить корреляцию этого метода и доли CAR+ клеток. Обоснование применения анализа по суррогатному маркеру должно включать данные по его чувствительности и специфичности.

Валидационные исследования на этапе выпуска продукта методом проточной цитометрии должны проводиться в соответствии с рекомендациями Международной конференцией по гармонизации (ICH) Q2 (R2) [2] и включать валидацию каждого флуоресцентно меченного маркера в панели. Определение робастности,

включая определение максимального времени хранения образцов до окрашивания и между окрашиванием и анализом, должно быть включено в это исследование.

При внесении изменений в процесс анализа необходимо провести оценку рисков, чтобы определить степень влияния внесенных изменений на CAR-T клетки. В том случае, если в методологию внесены существенные изменения, рекомендуется проводить ревалидацию процесса. Это необходимо для того, чтобы гарантировать соответствие характеристик ревалидированной методики критериям приемлемости. Повторная валидация также необходима в случае, когда методика анализа полностью заменяется другой [3].

При замене методики анализа на ортогональную (например, замена анализа активности определения цитопатического действия на опухолевые клетки на оценку высвобождения цитокинов) также требуется провести его квалификацию, а также предоставить данные, подтверждающие любые изменения критериев приемлемости анализа и его влияние на стабильность продукта.

Изучение подлинности, активности, жизнеспособности и других характеристик CAR-T препаратов методом проточной цитометрии (например, измерение уровня экспрессии CAR) требуется проводить на всех стадиях разработки продукта, в том числе на конечном продукте.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 05600026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер гос. учета НИР 124022200093-9).

Список литературы

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for industry. Considerations for the development of chimeric antigen receptor (CAR) T cell products. 2024. Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/156896/download>
2. EMA. ICH topic Q2 (R2) validation of analytical procedures: Text and methodology. 2023. Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q2r2-guideline-validation-analytical-procedures-step-5-revision-1_en.pdf
3. Покровский Н.С., Водякова М.А., Меркулов В.А., Мельникова Е.В. Особенности и ключевые параметры валидации методик фенотипирования клеточных линий, входящих в состав препаратов клеточной терапии // Иммунология. 2024. Т. 45, № 3. С. 343–354. EDN: DHBGVY doi: 10.33029/1816-2134-2024-45-3-343-354

Волик П.И.^{1,2} ✉, Замараев А.В.^{1,2}, Егоршина А.Ю.², Первушин Н.В.^{1,2}, Капуста А.А.¹, Тюрин-Кузьмин П.А.¹, Липатова А.В.², Кане Т.³, Лаврик И.Н.³, Животовский Б.Д.^{1,2,4}, Копейна Г.С.^{1,2}

Роль белка p62 в регуляции активации каспазы-2

¹ МГУ имени Ломоносова, Москва, Россия

² ИМБ имени Энгельгардта, Москва, Россия

³ Институт имени Отто фон Герике, Магдебург, Германия

⁴ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ pvolk96@gmail.com

Аннотация. Каспаза-2, уникальная консервативная цистеиновая протеаза, участвующая в нескольких фундаментальных клеточных процессах. Мы обнаружили двойственную роль белка p62 в регуляции активности каспазы-2: p62 может способствовать деградации каспазы-2 и стимулировать процесс её активации.

Ключевые слова: p62; каспаза-2; апоптоз; деградация белков; протеасома; аутофагия; убиквитинирование.

Volik P.I.^{1,2}, Zamaraev A.V.^{1,2}, Egorshina A.Y.², Pervushin N.V.^{1,2}, Kapusta A.A.¹, Tyurin-Kuzmin P.A.¹, Lipatova A.V.², Kaehne T.³, Lavrik I.N.³, Zhivotovsky B.D.^{1,2,4}, Kopeina G.S.^{1,2}

The role of p62 in regulation of caspase-2 activation

¹ Faculty of Medicine, MV Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

³ Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Center of Dynamic Systems (CDS), Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

⁴ Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract. Caspase-2 is a unique and conserved cysteine protease that is involved in several fundamental cellular processes. We have uncovered the dual role of p62 in regulating caspase-2 activity: it can foster the degradation of caspase-2 or facilitate its activation.

Keywords: p62; caspase-2; apoptosis; protein degradation; proteasome; autophagy; ubiquitination.

Канонической платформой активации каспазы-2 в ответ на повреждение ДНК является комплекс PID-Dosome, в который помимо каспазы-2 входят белки RAIDD и PIDD1 [1]. Тем не менее, было показано, что в ряде случаев каспаза-2 способна активироваться независимо от этого комплекса [2–4], что говорит о существовании альтернативных платформ активации каспазы-2. Для выявления новых белков-партнеров каспазы-2 было проведено исследование клеток НЕК293Т и U1810 в присутствии или в отсутствие цисплатина. Масс-спектрометрический анализ полученных образцов выявил несколько ко-преципитированных с каспазой-2 белков, включая p62 и компоненты пути убиквитинирования, такие как убиквитин и полиубиквитин. С помощью pull-down assay было установлено, что белки каспазы-2 и p62 могут непосредственно взаимодействовать друг с другом.

Для изучения роли белка p62 в деградации каспазы-2 опухолевые клетки были трансфицированы плазмидой, кодирующей последовательность p62. Было показано, что сверхэкспрессия p62 стимулировала активацию каспазы-2, сопровождающуюся образованием ее каталитически активных фрагментов и индукцией апоптоза, что подтверждалось расщеплением маркеров апоптоза каспазы-3 и PARP. Наблюдаемый p62-модулируемый процессинг каспазы-2 подавлялся при добавлении пан-каспазного ингибитора QVD, но уровень прокаспазы-2 при этом восстанавливался не полностью, что указывало на существование деградации каспазы-2. Данное предположение подтвердилось полным восстановлением уровня белка прокаспазы-2 при ингибировании протеасомы. При этом подавление аутофагии с помощью соответствующих

блокаторов не увеличивало количество каспазы-2 в клетках, что говорило об отсутствии вклада аутофагии в р62-зависимую деградацию этого белка. Методом RT-PCR было показано, что сверхэкспрессия гена р62 не влияла на уровень транскрипции *casp2*. Следовательно, р62 может запустить деградацию самой каспазы-2 как белка через протеасомы, но не влияет на активацию ее гена. Необходимо отметить, что сверхэкспрессия р62 приводила также к накоплению активных форм каспазы-2. Этот факт может свидетельствовать о р62-зависимой димеризации каспазы-2 и ее последующем автокаталитическом расщеплении.

Ранее было показано, что р62 через убиквитин может взаимодействовать с другой каспазой (каспазой-8), способствуя ее димеризации и последующей активации [5]. Чтобы проверить данный механизм р62-опосредованной активации в случае каспазы-2, нами сконструированы две мутантные формы белка mCherry-р62: 1) с делетированным убиквитин-связывающим доменом (mCherry-р62ΔUBD) и 2) с делетированными убиквитин-связывающим доменом и ZZ-доменом, который также способен связывать цепи убиквитина (mCherry-р62ΔUBDΔZZ). Для проверки влияния вырезанных доменов на димеризацию каспазы-2 была применена технология Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC). Для этого в клетки совместно вводились несколько конструктов, один из них содержал последовательность mCherry-р62 дикого типа, mCherry-р62ΔUBD либо mCherry-р62ΔUBDΔZZ, два других — CARD (домен белка, отвечающий за димеризацию) каспазы-2, соединенный с разными фрагментами белка Venus. Если какая-либо форма р62 опосредует димеризацию CARD, то должно происходить сближение фрагментов Venus, вследствие чего будет восстанавливаться структура флюорофора белка и возникать флюоресценция, детектируемая с помощью флюоресцентного микроскопа. Для того, чтобы исключить активацию каспазы-2 за счет работы других каспаз, клетки обрабатывались пан-каспазным ингибитором QVD. Данный метод показал, что при сверхэкспрессии mCherry-р62 дикого типа и mCherry-р62ΔUBD возникает димеризация Venus, в то время как при сверхэкспрессии мутанта mCherry-р62ΔUBDΔZZ димеризация отсутствует полностью, что позволяет говорить о существенной роли домена ZZ в р62-опосредованной димеризации и активации каспазы-2.

Важно отметить, что р62-зависимая активация каспазы-2 происходит независимо от комплекса PIDDosome, сборка которого приводит к активации каспазы-2 при ДНК-повреждениях. Так, подавление экспрессии гена ключевого белка данного комплекса, RAIDD, не влияло на р62-опосредованную активацию каспазы-2. Существенную роль убиквитин-связывающих доменов р62 во взаимодействии этого белка с каспазой-2 также подтвердили результаты аффинной хроматографии: преципитация р62 наблюдалась при совместной сверхэкспрессии каспазы-2 и mCherry-р62 дикого типа, но отсутствовала при продукции в клетках мутантов mCherry-р62ΔUBD либо mCherry-р62ΔUBDΔZZ. Этот факт подтвердил ключевую роль домена ZZ в связывании каспазы-2. Домен UBA, по-видимому, также участвует в стабилизации комплекса р62-каспаза-2.

Таким образом, нами установлено, что р62 способствует протеасомной деградации каспазы-2, а также ее активации, что приводит к повышению активности каспазы-2, каспазы-3 и усилению гибели клеток.

Список литературы

1. Tinel A., Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress // *Science*. 2004. Vol. 304, N 5672. P. 843–846. doi: 10.1126/science.1095432
2. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Orrenius S., Zhitovsky B. Functional connection between p53 and caspase-2 is essential for apoptosis induced by DNA damage // *Oncogene*. 2006. Vol. 25. P. 5683–5692. doi: 10.1038/sj.onc.1209569
3. Ribe E.M., Jean Y.Y., Goldstein R.L., et al. Neuronal caspase 2 activity and function requires RAIDD, but not PIDD // *Biochem J*. 2012. Vol. 444, N 3. P. 591–599. doi: 10.1042/BJ20111588
4. Kopeina, G.S. Zamaraev A.V., Zhivotovsky B.D., Lavrik I.N. Identification of new complex for caspase-2 activation after DNA damage // *Russ J Bioorganic Chem*. 2016. Vol. 42. P. 74–82. doi: 10.1134/S1068162016010064
5. Lee S.H., Cho W.J., Najy A.J., et al. p62/SQSTM1-induced caspase-8 aggresomes are essential for ionizing radiation-mediated apoptosis // *Cell Death Dis*. 2021. Vol. 12. ID 997. doi: 10.1038/s41419-021-04301-7

Волкова М.В.^{1,2} ✉, Ковалевский Я.Б.², Еремин П.С.¹, Марков П.А.¹

Влияние модификации хитозана аскорбиновой, гликолиевой и молочной кислотами на цитосовместимость с клетками человека

¹ ФГБУ Национальный медицинский исследовательский центр реабилитологии и курортологии Минздрава России, Москва, Россия

² Химическая компания «Орион», Санкт-Петербург, Россия

✉ biotech.volkova@list.ru

Аннотация. С целью разработки новых высокоэффективных повязок для лечения ран были изготовлены губки на основе водорастворимых производных хитозана. Установлено, что изделия из лактата или гликолата хитозана стимулируют пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток человека.

Ключевые слова: аскорбат хитозана; гликолат хитозана; лактат хитозана; цитотоксичность; мезенхимальные стволовые клетки человека.

Volkova M.V.^{1,2}, Kovalevsky Ya.B.², Eremin P.S.¹, Markov P.A.¹

Effect of chitosan modification with ascorbic, glycolic and lactic acids on cytocompatibility with human cells

¹ National Medical Research Center for Rehabilitation and Balneology, Moscow, Russia

² Chemical company "Orion", Saint Petersburg, Russia

Abstract. In order to develop new highly effective dressings for wound treatment, sponges based on water-soluble chitosan derivatives were manufactured. It was found that products made from chitosan lactate or glycolate stimulate the proliferative activity of human mesenchymal stem cells.

Keywords: chitosan ascorbate; chitosan glycolate; chitosan lactate; cytotoxicity; human mesenchymal stem cells.

Несмотря на многочисленное количество разработанных и зарегистрированных раневых покрытий, до сих пор существует острая необходимость в создании и производстве высокоэффективных медицинских изделий. В первую очередь, это касается лечения незаживающих (хронических) ран, таких как пролежни, диабетические язвы стопы и хронические венозные язвы ног. Основная опасность данных заболеваний заключается в том, что они имеют высокие риски ампутации конечностей или пальцев, а их поздние стадии характеризуются высоким уровнем смертности пациентов. В целом, хронические раны приводят к снижению качества жизни и увеличению нагрузки на систему здравоохранения, так как пациенты с такими заболеваниями длительно пребывают в медицинских учреждениях [1].

Перспективным и используемым полимером для изготовления раневых повязок и биологически активных покрытий является хитозан, участвующий во всех стадиях заживления ран [2]. Путем химического синтеза получают различные производные хитозана, например его водорастворимые соли. Это позволяет модулировать физико-химические, механические и биологические свойства раневого покрытия, в том числе адгезию, пролиферативную и функциональную активность клеток, вовлеченных в процессы регенерации поврежденной ткани.

В исследовании оценивали биосовместимость губок из аскорбата хитозана, гликолата хитозана и лактата хитозана, в отношении мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) человека. Губки были получены методом лиофильного высушивания. Плотность губок варьируется в пределах от 0,16 до 0,29 г/см³;

pH водной вытяжки от 4,2 до 5,0; сорбционная емкость по воде от 4,0 до 11,8 г/г. Перед началом цитологических исследований все изделия прошли радиационную стерилизацию. Губки были предоставлены ООО Химическая компания «Орион».

Исследования проводили на клеточной культуре ММСК человека. Образцы губок нарезали на фрагменты размером 1×1 см и предварительно инкубировали в питательной среде DMEM/F12 (Biowest, Франция) с 10% FBS (Biowest, Франция) в течение 24 часов при 37°C. ММСК высаживали в 6-луночные и 96-луночные планшеты для оценки морфологических характеристик клеток и проведения МТТ-теста. Через сутки питательную среду от исследуемых образцов отбирали для оценки цитотоксичности, а фрагменты губок переносили в лунки 6-луночного планшета. Для изучения влияния образцов на морфологию клеток ММСК культивировали с образцами в течение двух суток, затем проводили окрашивание клеток родамином. Размеры и количество клеток оценивали с использованием световой и люминесцентной микроскопии и встроенного программного обеспечения Image Analysis (Leica Microsystems). Для определения цитотоксичности продуктов биodeградации использовали кондиционированную питательную среду, полученную после инкубации образцов. Для этого инкубационную среду разводили в концентрациях от 0,5 до 10 мг сухой массы губки на 1 мл свежей питательной среды. ММСК с исследуемыми средами инкубировали в течение 24 часов. Определение с помощью МТТ проводили по стандартному протоколу, растворение кристаллов формазана осуществляли в ДМСО (Sigma Aldrich, США).

Установлено, что при совместной инкубации губок из лактата и гликолата хитозана с ММСК человека они не оказывают влияния на морфологию клеток, размеры и форма клеток сопоставимы с контрольными значениями. Губки из аскорбата хитозана вызывают гибель клеток. Оценка влияния продуктов биodeградации хитозановых губок на метаболическую активность клеток показала, что среда, полученная из лактата хитозана, в среднем на 20–30% стимулирует метаболическую активность клеток во всем диапазоне исследованных концентраций. Кондиционированная среда, полученная из гликолата хитозана в концентрации 10 мг/мл, ингибирует метаболическую активность ММСК. Уменьшение концентрации кондиционированной питательной среды до 5 мг/мл демонстрирует стимулирующее действие: метаболическая активность клеток увеличивается на 30–50% по сравнению с контролем.

Таким образом, полученные результаты указывают, что губки из лактата хитозана могут быть использованы как самостоятельные медицинские изделия для закрытия ран, так и в качестве каркасов для тканевой инженерии. Для повышения биологической активности губок из гликолата хитозана, вероятно, целесообразно снизить концентрацию гликолевой кислоты в составе хитозана. Модификация хитозана аскорбиновой кислотой не целесообразна при изготовлении биоматериалов медицинского назначения.

Список литературы

1. Barrientos S., Brem H., Stojadinovic O., Tomic-Canic M. Clinical application of growth factors and cytokines in wound healing // *Wound Repair Regen.* 2014. Vol. 22, N 5. P. 569–578. doi: 10.1111/wrr.12205
2. Xu X., Zeng Y., Chen Z., et al. Chitosan-based multifunctional hydrogel for sequential wound inflammation elimination, infection inhibition, and wound healing // *Int J Biol Macromol.* 2023. Vol. 235. ID 123847. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.123847

Воловиков Е.А.¹ ✉, Смирнова А.С.², Богомазова А.Н.¹

Клеточная модель для изучения роли GNAO1 в нейрогенезе

¹ Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины им. Лопухина, Москва, Россия

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

✉ volovikovea@gmail.com

Аннотация. Ген GNAO1 кодирует субъединицу комплекса G-белков, мутации в нем вызывают ряд заболеваний мозга с ранним проявлением симптомов. Предложенная нами клеточная модель на основе ИПСК и лентивирусных векторов позволяет изучать активность мутантного и нормального GNAO1 на ранних стадиях нейрогенеза.

Ключевые слова: ИПСК; GNAO1; нейроны; эпилепсия; моделирование.

Volovikov E.A.¹, Smirnova A.S.², Bogomazova A.N.¹

A cellular model to study the role of GNAO1 in neurogenesis

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The GNAO1 gene encodes a subunit of the G-protein complex, mutations in which cause a number of brain diseases with early manifestation of symptoms. Our proposed cell model based on iPSCs and lentiviral vectors allows studying the activity of mutant and normal GNAO1 at early stages of neurogenesis.

Keywords: iPSC; GNAO1; neurons; epilepsy; modeling.

Ген GNAO1 кодирует альфа-субъединицу гетеротримерного комплекса G-белков и участвует в передаче сигнала от G-связанных рецепторов в нейронах. Различные мутации в этом гене могут приводить к развитию двух наследственных заболеваний — ранней эпилептической энцефалопатии и нарушению контроля движений. Тип развивающегося заболевания зависит от конкретной мутации [1], например, мутация G203R приводит к одновременному развитию обоих заболеваний. Сегодня не существует универсальной терапии для GNAO1-связанных заболеваний, поэтому проблема изучения молекулярных механизмов работы GNAO1 в норме и патологии остается актуальной. Особенный интерес вызывают функции GNAO1 в раннем нейрогенезе, так как у ряда пациентов симптомы начинают проявляться сразу после рождения.

Для оценки локализации мутантного и нормального белка GNAO1 в клетке мы создали систему лентивирусных векторов, в которых полная белковая последовательность GNAO1 (дикого типа или с мутацией G203R) экспрессируется с универсального SFFV промотора и с С-конца слита с репортерным белком GFP. Так как добавление молекулы репортера к GNAO1 может нарушать взаимодействие GNAO1 с партнерами, мы создали лентивирусные вектора, экспрессирующие химерный белок FLAG-GNAO1.

Ранее из кожных фибробластов здорового донора нами была получена линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Методом направленной дифференцировки ИПСК мы получили культуры нейроэпителлия, глиальных клеток и ГАМК-эргических нейронов среднего мозга. Для каждого типа культуры было проведено иммуоцитохимическое окрашивание на характерные маркеры соответствующего типа клеток для подтверждения эффективности дифференцировки. Затем полученные культуры заразили лентивирусными векторами, экспрессирующими GNAO1-GFP или FLAG-GNAO1.

Культуры, зараженные FLAG-GNAO1, по результатам вестерн-блоттинга экспрессируют целевой белок FLAG-GNAO1 и могут быть использованы в дальнейшей работе.

Прижизненная визуализация GNAO1-GFP показала, что в ИПСК, нейроэпителлии, клетках глии и зрелых нейронах как нормальный, так и мутантный (G203R) GNAO1 локализуется на мембране клетки и в аппарате

Гольджи, что соответствует литературным данным для других клеточных типов [2]. В клетках, зараженных вектором, экспрессирующим только GFP, сигнал был локализован в цитоплазме и ядре. Таким образом, можно говорить о том, что флуоресценция GNAO1-GFP соответствует локализации GNAO1.

Таким образом, нами создана система лентивирусных векторов для изучения молекулярных механизмов развития GNAO1-энцефалопатий, в том числе и в раннем развитии организма. Мутация G203R в гене GNAO1 не нарушает локализацию белка во время нейрогенеза.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-25-00360).

Список литературы

1. JoJo Yang Q.-Z., Porter B.E., Axen E.T. GNAO1-related neurodevelopmental disorder: Literature review and caregiver survey // *Epilepsy Behav Rep.* 2022. Vol. 21. ID 100582. doi: 10.1016/j.ebr.2022.100582
2. Nakamura K., Kodera H., Akita T., et al. De Novo mutations in GNAO1, encoding a Gα subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy // *Am J Hum Genet.* 2013. Vol. 93, N 3. P. 496–505. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014

Волов Н.В.✉, Григорьева Ю.В.

К вопросу об остеогенном регенераторном потенциале слизисто-надкостничной выстилки верхнечелюстной пазухи у мужчин второго периода зрелости

Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

✉ yu.v.grigoreva@samsmu.ru

Аннотация. В работе сделан акцент на особенностях строения слизисто-надкостничной выстилки верхнечелюстной пазухи; обосновывается причина ее слабой регенераторной способности в остеопрогениторном направлении; источником образования костных структур предлагается рассматривать популяции α -SMA позитивных клеток.

Ключевые слова: слизисто-надкостничная выстилка; верхнечелюстная пазуха; надкостница; мембрана Шнайдера; альфа-гладкомышечный актин.

Volov N.V., Grigoryeva Yu.V.

On the issue of osteogenic regenerative potential of the mucoperiosteal lining of the maxillary sinus in men of the second period of maturity

Samara State Medical University, Samara, Russia

Abstract. The article focuses on the structural features of the muco-periosteal lining of the maxillary sinus; the reason for its weak regenerative ability in the osteoprogenitor direction is substantiated; the source of bone structure formation is proposed to consider populations of α -SMA positive cells.

Keywords: mucoperiosteal lining; maxillary sinus; periosteum; Schneider's membrane; alpha-smooth muscle actin.

Верхнечелюстная пазуха — самая крупная придаточная полость носа, занимающая центральную часть тела верхней челюсти. Особенностью данной костной полости является постоянное увеличение ее объема в течение всей жизни человека. Считается, что в детском и молодом возрасте увеличение объема данной полости обусловлено формированием неба и ростом альвеолярной кости [1], а во взрослом — уменьшением массы альвеолярной кости изнутри из-за ее слабого регенераторного потенциала [2]. Как известно, изнутри полость верхнечелюстной пазухи образована особой выстилкой (мембраной Шнайдера), которая состоит из трех основных слоев: респираторного эпителия, собственной пластинки и собственно надкостницы [1]. Данная совокупность структур рассматривается как единый комплекс, который легко выделяется или отслаивается от костного матрикса верхней челюсти при ее любых травматических повреждениях. Анализ современных литературных источников показал недостаток научных исследований, посвященных структурному анализу надкостницы, покрывающей верхнюю челюсть со стороны пневматизированной полости, а также ее участия в регенерации кости и постнатальном морфогенезе. Исходя из сказанного, целью работы явился морфологический анализ слизисто-надкостничной выстилки верхнечелюстной пазухи и формирование представлений о возможном остеопрогениторном потенциале ее надкостницы. В исследовании приняли участие 20 человек (мужчин второго периода зрелости), которые находились на лечении в ООО «Амбулаторный центр № 1» г. Самара (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО-63-01-004326 от 10 августа 2017 года (бессрочно)) в период с января 2023 года по июль 2024 года, по причине ятрогенной перфорации верхнечелюстной пазухи и удаления из нее инородных тел. С информированного согласия

пациентов в ходе оперативного вмешательства из места операционного доступа был получен 6 мм участок слизисто-надкостничной выстилки передней стенки верхнечелюстной пазухи. Полученный материал подлежал фиксации в забуференном формалине с последующей автоматизированной гистологической проводкой (Leica ASP 300, Германия) и пропитыванием объектов в парафине “Histomix” (BioOptica, Россия). С полученных блоков готовили срезы толщиной 4 мкм, которые для обзорной световой микроскопии окрашивали гематоксилином и эозином. Для поиска возможных остеогенных источников в надкостнице мембраны Шнайдера использовали иммуногистохимический метод с применением моноклонального антитела к гладкомышечному актину (α -SMA) (Дако, Дания). Результаты оценивали после постановки положительного и отрицательного контролей. Установлено, что у взрослых мужчин надкостница, покрывающая переднюю стенку верхней челюсти со стороны пневматизированной полости, имеет однослойное строение. Она лишена камбиального (клеточного) слоя с кровеносными сосудами и представлена одиночным тонким пучком коллагеновых волокон. Таким образом, надкостница мембраны Шнайдера демонстрировала сходство с волокнистым слоем надкостницы трубчатой кости. Отсутствие клеточного слоя явилось свидетельством низкого регенераторного потенциала надкостницы верхней челюсти. Также установлено, что в собственной пластинке слизистой оболочки, прилежащей к надкостнице, полностью отсутствует жировая ткань, клетки которой, как отмечено в литературе, могут быть источником образования стволовых клеток с остеогенным потенциалом [3]. Помимо стволовых клеток жировой ткани, к числу остеопрогениторных клеток относят перicyты [4] и клетки экспрессирующие α -SMA [5]. Использование моноклональных антител к α -SMA позволило выявить в структурах мембраны Шнайдера позитивные клетки, которые были локализованы как в собственной пластинке слизистой оболочки, так и по свободному краю надкостницы. Учитывая то, что в стенке мембраны Шнайдера нет жировой ткани и в надкостнице отсутствует клеточный слой с развитыми кровеносными сосудами, мы считаем, что популяции альфа-гладкомышечных актин-позитивных клеток, при создании определенных условий, способны служить одним из источников остеопрогениторных клеток. Полученные данные могут иметь важное значение для врачей-оториноларингологов при выборе хирургических доступов и операционных приемов при лечении пациентов ринологического профиля.

Список литературы

1. Whyte A., Boeddinghaus R. Correction to the maxillary sinus: physiology, development and imaging anatomy // *Dentomaxillofac Radiol J Head Neck Imag.* 2019. Vol. 48, N 8. ID 20190205. doi: 10.1259/dmfr.20190205
2. Cho S.H., Kim T.H., Kim K.R., et al. Factors for maxillary sinus volume and craniofacial anatomical features in adults with chronic rhinosinusitis // *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010. Vol. 136, N 6. P. 610–615. doi:10.1001/archoto.2010.75
3. Hattori H., Sato M., Masuoka K., et al. Osteogenic potential of human adipose tissue-derived stromal cells as an alternative stem cell source // *Cells Tissues Organs.* 2004. Vol. 178, N 1. P. 2–12. doi: 10.1159/000081088
4. Meyers C.A., Casamitjana J., Chang L., et al. Pericytes for therapeutic bone repair. В кн.: Birbrair A., editor. *Pericyte biology — novel concepts. Advances in experimental medicine and biology.* Vol. 1109. Springer, Cham. 2018. P. 21–32. doi: 10.1007/978-3-030-02601-1_3
5. Kalajzic Z., Li H., Wang L.-P., et al. Use of an alpha-smooth muscle actin GFP reporter to identify an osteoprogenitor population // *Bone.* 2008. Vol. 43, N 3. P. 501–510. doi: 10.1016/j.bone.2008.04.023

Волошин С.Ю.¹✉, Усанова А.П.¹, Логинова Н.П.¹, Анискин Д.А.¹, Аксенова Н.А.¹, Романцова О.М.², Красавин М.Ю.³, Уласов И.В.¹, Антошин А.А.¹, Тимашев П.С.¹

Лактоферриновые частицы потенцируют противоопухолевое действие ингибитора карбоангидразы II в отношении клеточной линии саркомы Юинга

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

² Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

✉ voloshinsyu03@gmail.com

Аннотация. В исследовании оценивали потенциал ингибитора карбоангидразы II OX72 и частиц на основе лактоферрина для лечения саркомы Юинга. Было показано, что частицы на основе лактоферрина и хондроитинсульфата значительно усиливают цитотоксические эффекты OX72 по отношению к клеточным линиям саркомы Юинга.

Ключевые слова: саркома Юинга; системы доставки лекарств; ингибитор карбоангидразы II; таргетная терапия; наночастицы лактоферрина; резистентность к доксорубину.

Voloshin S.Yu.¹, Usanova A.P.¹, Loginova N.P.¹, Aniskin D.A.¹, Aksenova N.A.¹, Romantsova O.M.², Krasavin M.Yu.³, Ulasov I.V.¹, Antoshin A.A.¹, Timashev P.S.¹

Lactoferrin particles potentiate the antitumor effect of carboanhydrase II inhibitor against Ewing's sarcoma cell lines

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

² National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

³ St Petersburg University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study evaluated the potential of the carboanhydrase II inhibitor OX72 and lactoferrin-based particles for the treatment of Ewing's sarcoma. Lactoferrin and chondroitin sulfate-based particles were shown to significantly enhance the cytotoxic effects of OX72 against Ewing's sarcoma cell lines.

Keywords: Ewing's sarcoma; drug delivery systems; carbonic anhydrase ii inhibitor; targeted therapy; lactoferrin nanoparticles; doxorubicin resistance.

Саркома Юинга (СЮ) является одним из наиболее агрессивных злокачественных новообразований, особенно часто поражающих детей и подростков. Ранее в исследованиях было продемонстрировано, что лактоферрин обладает противоопухолевой активностью, а способен усиливать проникновение химиотерапевтических препаратов внутрь клеток. Также было показано, что при формировании наночастиц на основе лактоферрина и хондроитин-6-сульфата возможно заключение в структуру комплекса химиотерапевтического препарата [1].

В рамках данного исследования изучалась эффективность терапевтического подхода использования ингибитора карбоангидразы II (OX72), наночастиц на основе лактоферрина (LNPs) и их комбинации на клеточных линиях саркомы Юинга. Оценку цитотоксического потенциала проводили с помощью метаболического теста Alamar Blue.

Было показано, что наночастицы на основе лактоферрина и хондроитин-6-сульфата значительно усиливают цитотоксические эффекты OX72 по отношению к клеточным линиям саркомы Юинга A673, ES36

и T69. Особенно значительным было увеличение чувствительности к загруженным частицам у резистентных к доксорубину клеток, где наблюдалось повышение чувствительности на 40%. Кроме того, выживаемость клеток ES36, обработанных комбинацией LNPs и OX72 (10 мкмоль), снизилась в четыре раза по сравнению с контрольными клетками (M19).

Результаты исследования демонстрируют потенциал наночастиц на основе лактоферрина для усиления терапевтической эффективности ингибитора OX72 при лечении саркомы Юинга. Эти данные открывают перспективы для разработки новых целенаправленных подходов к лечению данной злокачественной патологии, что может существенно улучшить качество жизни и выживаемость пациентов.

Список литературы

1. Abd Elwakil M.M., Mabrouk M.T., Helmy M.W., et al. Inhalable lactoferrin-chondroitin nanocomposites for combined delivery of doxorubicin and ellagic acid to lung carcinoma // *Nanomedicine (Lond)*. 2018. Vol. 13, N 16. P. 2015–2035. doi: 10.2217/nnm-2018-0039

Воронкина И.В.¹ ✉, Смагина Л.В.¹, Островская А.А.², Мальцева С.В.¹, Пигаревский П.В.¹,
Лукин С.В.³, Таянский Д.А.¹

Активность ММП и содержание некоторых компонентов внеклеточного матрикса в тканях каротидных артерий человека при атеросклерозе

¹ ФГБНУ «ИЭМ», Санкт-Петербург, Россия

² СПбГТИ(ТУ), Санкт-Петербург, Россия

³ СЗОНКЦ им. Л.Г. Соколова ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

✉ voronirina@list.ru

Аннотация. Проведено изучение динамики активности ММП и состояния компонентов ВКМ при атеросклерозе человека. Проведен биохимический и гистологический анализ бляшек сонных артерий человека, материал для анализа получали интраоперационно. Найдены различия в активностях ММП и содержании ламинина и коллагенов.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы; внеклеточный матрикс; атеросклероз; каротидные бляшки.

Voronkina I.V.¹, Smagina L.V.¹, Ostrovskaya A.A.², Maltseva S.V.¹, Pigarevsky P.V.¹, Lukin S.V.³, Tanyansky D.A.¹

The activity of MMP and the content of some extracellular matrix components in human carotid artery tissue in atherosclerosis

¹ FSBSI "IEM", Saint Petersburg, Russia

² SPbSIT(TU), Saint Petersburg, Russia

³ FSBI "North-Western district scientific and clinical center named after L. G. Sokolov FMBA", Saint Petersburg, Russia

Abstract. The dynamics of MMP activity and ECM components in human atherosclerosis were studied. Biochemical and histological analysis of human carotid artery plaques was performed, the material for analysis was taken at operations. Differences were found in MMP activity and laminin and collagens content.

Keywords: matrix metalloproteinases; extracellular matrix; atherosclerosis; carotid plaques.

Роль внеклеточного матрикса (ВКМ) в формировании атеросклероза является в последнее время предметом широкого обсуждения. Изменения компонентов ВКМ, их механических свойств и взаимодействий могут оказывать влияние на образование и стабильность атеросклеротических бляшек, так как компоненты ВКМ в составе гликокаликса первыми контактируют с веществами и клетками, находящимися в кровяном русле. Состав и структуру ВКМ сосудов изменяют такие ферменты, как матриксные металлопротеиназы (ММП), участвующие в процессах ремоделирования ВКМ. Поврежденный гликокаликс теряет барьерную функцию, увеличивая сосудистую проницаемость, способствуя дополнительной активации ММП и вызывая дальнейшее повреждение ВКМ. В связи с этим интересно изучение динамики содержания и активности ММП, а также состояние некоторых компонентов ВКМ при развитии атеросклеротических повреждений. Был проведен биохимический анализ атеросклеротических бляшек сонных артерий человека и неизмененных тканей выделенных из этих же сосудов. Материал для исследования получали в ходе каротидной эндартерэктомии (20 образцов). Тип бляшки (стабильная/нестабильная) определяли гистологически. Идентификацию протеаз ММП-3 и -12, компонентов ВКМ коллагенов I и IV, и ламинина проводили методом вестерн-блоттинга, наличие и активность ММП-1, -2 и -9 изучали методом зимографии. Отличия в активности ММП и содержании

некоторых компонентов ВКМ были обнаружены для стабильных/нестабильных атеросклеротических бляшек (АСБ). Содержание ММП-12, а также активных форм ММП-1 и ММП-9 значительно различалось для стабильных и нестабильных АСБ. В АСБ наблюдали также снижение содержания ламинина и значительную фрагментацию коллагенов I и IV. Действие ММП приводит к образованию матрикриптинов — фрагментов и пептидов компонентов ВКМ вследствие появления активных форм ММП. Коллаген и протеогликаны, ламинин и эластин — основные источники матрикриптинов и пептидов [1, 2]. Образующие матрикриптины обладают собственной биологической активностью и способны далее изменять микроокружение клеток в стенках сосудов, что может приводить к дальнейшему развитию атеросклеротических поражений [3, 4]. Начальную роль возможно играют ферменты, в том числе ММП, способствующие образованию матрикриптинов [5].

Полученные на данном материале результаты показали, что количество и состояние таких компонентов ВКМ, как коллагены I и IV, ламинин и ММП-12, а также активность ММП-1 и ММП-9 в нормальных тканях сонной артерии значительно отличаются от АСБ. При этом содержание указанных компонентов в стабильных бляшках вариабельно, что вероятно объясняется индивидуальными особенностями пациентов, их терапией и наличием сопутствующих заболеваний. Работа выполнялась по Госзаданию (шифр № FGWG-2022-0003).

Список литературы:

1. Ricard-Blum S., Salza R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix // *Exp Dermatol.* 2014. Vol. 23, N 7. P. 457–463. doi: 10.1111/exd.12435
2. Kostourou V., Papalazarou V. Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer // *Biochim Biophys Acta (BBA)-Gen Subj.* 2014. Vol. 1840, N 8. P. 2403–2413. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.018
3. Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A. Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules // *Am J Pathol.* 2000. Vol. 156, N 5. P. 1489–1498. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65020-1
4. Mohindra R., Agrawal D.K., Thankam F.G. Altered vascular extracellular matrix in the pathogenesis of atherosclerosis // *J Cardiovasc Trans Res.* 2021. Vol. 14. P. 647–660. doi: 10.1007/s12265-020-10091-8
5. Ricard-Blum S., Vallet S.D. Proteases decode the extracellular matrix cryptome // *Biochimie.* 2016. Vol. 122. P. 300–313. doi: 10.1016/j.biochi.2015.09.016

Высоких М.Ю.^{1–3} ✉, Аверина О.А.¹, Адрианов М.А.¹, Виговский М.А.⁴, Филиппов В.В.⁴, Бородай Я.Р.⁴, Марей М.В.², Григорьева О.А.⁴, Вепхвадзе Т.Ф.³, Курочкина Н.С.³, Манухова Л.А.², Ефименко А.Ю.⁴, Попов Д.В.³, Скулачев В.П.¹

Возраст-зависимый контроль продукции митохондриальных активных форм кислорода при сопряжении креатинкиназной реакции и окислительного фосфорилирования в скелетной мышце долго- и короткоживущих видов

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», Москва, Россия

³ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

⁴ Медицинский научно-образовательный институт Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ mikhail.vyssokikh@gmail.com

Аннотация. При старении в митохондриях скелетных мышц человека снижается взаимодействие креатинкиназы и мембранных белков митохондрии ANT и VDAC, что приводит к дисрегуляции генерации трансмембранного потенциала и продукции активных форм кислорода.

Ключевые слова: митохондрии; активные формы кислорода; старение; скелетная мышца; креатинкиназа.

Vysokikh M.Yu.^{1–3}, Averina O.A.¹, Adrianov M.A.¹, Vigovsky M.A.⁴, Filippov V.V.⁴, Boroday Y.R.⁴, Marey M.V.², Grigorieva O.A.⁴, Vepkhvadze T.F.³, Kurochkina N.S.³, Manukhova L.A.², Efimenko A.Yu.⁴, Popov D.V.³, Skulachev V.P.¹

Age-dependent control of mitochondrial reactive oxygen species production during coupling of creatine kinase reaction and oxidative phosphorylation in skeletal muscle of long and short living species

¹ A.N. Belozersky Research Institute of Physico Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

³ Institute of Medical and Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Medical Scientific and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. During aging, the interaction of creatine kinase and the mitochondrial membrane proteins ANT and VDAC in the mitochondria of human skeletal muscles decreases, which leads to dysregulation of the generation of transmembrane potential and the production of reactive oxygen species.

Keywords: mitochondria; reactive oxygen species; aging; skeletal muscle; creatine kinase.

Одним из интегральных признаков старения является прогрессирующее с возрастом уменьшение массы скелетных мышц, а также их функциональных возможностей (сила, работоспособность и инсулиновая чувствительность). Известно, что увеличение и нарушения регуляции продукции митохондриальных активных форм кислорода являются одними из основных триггеров старения скелетных мышц. В нашем исследовании был впервые для видов с различной продолжительностью жизни показан возрастной характер продукции митохондриальных активных форм кислорода, ассоциированный как с общим снижением соотношения

октамер/димер для митохондриальной креатинкиназы, так и с уменьшением ассоциации этого фермента с каналоформером внешней мембраны VDAC1 и транслокатором адениновых нуклеотидов внутренней мембраны (ANT). Для исследования брали биопсию *m. vastus lateralis* у 10 молодых здоровых добровольцев и 70 пациентов (26–85 лет) с многолетним первичным артрозом коленного/тазобедренного сустава. Также проводили сравнительный анализ указанных параметров для образцов, полученных из ткани мышц долгоживущего грызуна *Heterocephalus glaber* ($n = 7$) и мыши *Mus musculus* (C57Bl6, $n = 30$). Оказалось, что старение, в отличие от снижения двигательной активности и развития хронического воспаления, вызывает выраженное увеличение продукции перекиси изолированными митохондриями во всех исследуемых образцах скелетных мышц, но в разной степени и различной ассоциации со скоростью окислительного фосфорилирования. Это коррелировало с возраст-зависимым распределением октамера и димера в участках контактных сайтов и в межмембранном пространстве митохондрий, снижением скорости сопряженного дыхания выделенных митохондрий и дыхания при стимуляции субстратом фермента креатином в присутствии АТФ. Обсуждается, что эти изменения и различия для коротко- и долгоживущих грызунов, а также для человека могут быть вызваны разной возрастной динамикой снижения содержания кардиолипина — потенциального регулятора митохондриального микрокомпартамента, содержащего VDAC1, ANT и креатинкиназу. Полученные результаты способствуют более глубокому пониманию возрастных патогенетических процессов в скелетных мышцах и открывают перспективы для поиска фармакологических/физиологических подходов к коррекции этих патологий.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-14-00160 «Сравнительный анализ возрастных сигнатур у долго- и короткоживущих представителей *Heterocephalus glaber*: каст-специфичность поведенческих, биохимических и транскриптомных профилей» (работа с биоматериалом животных) и государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (работа с биоматериалом пациентов).

Гайдамака А.О. ✉, Александрова А.Д., Румянцева С.М., Воротеляк Е.А.

Гормональная регуляция YAP/TAZ сигналинга в CD90⁺ прогениторной популяции стромы эндометрия мыши

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

✉ stadtrand@yandex.ru

Аннотация. Эндометрий является динамичной тканью, которая проходит быстро сменяющиеся друг друга фазы регенерации, дифференцировки и гибели. Предполагается, что регуляция этих процессов осуществляется через YAP/TAZ сигналинг. Его активность гормонально модулируется в прогениторных клетках, поддерживающих гомеостаз эндометрия.

Ключевые слова: строма эндометрия; прогениторные клетки; половые стероидные гормоны; YAP/TAZ сигналинг.

Gaidamaka A.O., Alexandrova A.D., Rumiantseva S.M., Vorotelyak E.A.

Hormonal regulation of YAP/TAZ signaling in the CD90⁺ progenitor cell population of mouse endometrial stromal cells

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Endometrium is a dynamic tissue that undergoes rapidly transition through phases of regeneration, differentiation, and death. These processes are thought to be regulated by YAP/TAZ signaling. Its activity is hormonally modulated in progenitor cells that maintain endometrial homeostasis.

Keywords: endometrial stroma; progenitor cells; sex steroid hormones; YAP/TAZ signaling.

Репродуктивный цикл матки — это точно слаженный процесс преобразования эндометрия, целью которого является подготовка к потенциальной беременности. Менструальный цикл человека включает фазы пролиферации, дифференцировки и массовой гибели клеток. У мыши фазы эстрального (вагинального) цикла также соответствуют сменяющим друг друга фазам пролиферации и дегенерации эндометрия. Возможность протекания подобных глобальных перестроек требует сложной сети молекулярных путей взаимодействия стромальных, эпителиальных и иммунных клеток. Нарушение тех или иных элементов сети зачастую приводит к потере возможности настроить диалог как между клетками эндометрия, так и с эмбрионом, что становится причиной бесплодия.

Известно, что циклическое обновление эндометрия поддерживается различными типами клеток, в частности стволовыми и прогениторными популяциями клеток стромального компартмента, такими как эндометриальные МСК, side population и label-retaining cells [1]. Сейчас особое внимание уделяется функциям стволовых клеток, связанным не с восстановлением ткани при повреждении, а поддержанием ее гомеостаза. Однако для эндометрия имеются лишь фрагментарные знания о роли различных популяций стромальных клеток во время физиологических гормон-зависимых процессов, в частности децидуализации и имплантации.

Yes-associated protein 1 (YAP1; YAP) и WW-domain-containing transcription regulator 1 (WWTR1; TAZ) являются транскрипционными коактиваторами, регулирующими экспрессию генов, отвечающих за клеточную пролиферацию, миграцию, дифференцировку и ответ на стресс [2]. Поскольку эндометрий претерпевает значительные перестройки во время репродуктивного цикла и беременности, мы полагаем, что YAP/TAZ сигналинг может быть задействован в этих процессах. На настоящий момент существует предположение,

что YAP и TAZ активируют пути защиты от окислительного стресса во время имплантации [3]. На этом этапе стромальный компартмент проходит децидуализацию, то есть дифференцировку клеток стромы для приобретения рецептивности к эмбриону и поддержания его дальнейшего развития. Другие работы несут лишь описательный характер и не объясняют наблюдаемые явления.

Наша работа посвящена изучению роли YAP/TAZ сигналинга в популяции клеток стромы эндометрия мыши, несущих маркер МСК — CD90. Ранее мы обнаружили, что CD90⁺ клетки формируют обширную популяцию клеток стромы и подстилают люминальный и железистый эпителий эндометрия. Мы изучили протеом CD90⁺ и CD90⁻ клеток небеременной мыши и показали, что в CD90⁺ популяции высоко представлены белки, отвечающие за регуляцию транскрипции и трансляции, а также целостность генома. При этом для CD90⁻ клеток были характерны белки, участвующие в организации актинового цитоскелета. В дополнение к этому для CD90⁺ клеток были характерны белки, отвечающие за процессы, связанные с Hippo-сигналингом, который, как известно, регулирует активность YAP и TAZ. При оценке уровня экспрессии генов *Yap1* и *Wwtr1* в свежеразделенных клетках стромы обеих популяций после флуоресцентно активированной сортировки клеток оказалось, что они высокоэкспрессированы в CD90⁺ клетках относительно CD90⁻.

Для получения более расширенной характеристики обеих популяций мы изучили их способность отвечать на гормональные воздействия *in vitro*. Мы выявили, что обе популяции клеток имеют сходные изменения уровня экспрессии эстрадиол- и прогестерон-зависимых генов в соответствующих гормональных условиях культивирования. Так, в CD90⁺ и CD90⁻ клетках уровень экспрессии *Fgf10* и *Fgf18* снижался в условиях культивирования с прогестероном. Наоборот, уровень экспрессии *Prl* и *Hand2* увеличивался в аналогичных условиях. Экспрессия *Yap1* и *Wwtr1* и их мишеней, *Ccn1* и *Ccn2*, в целом не зависела от гормональных режимов культивирования.

Не выявив различий в экспрессии генов, ассоциированных с YAP/TAZ сигналингом, мы решили оценить их экспрессию у овариоэктомированных мышей, которым предварительно вводили эстрадиол и прогестерон. Оказалось, что оба гормона оказывают стимулирующий эффект на экспрессию *Yap1*. При этом уровень экспрессии *Wwtr1* снижался в условиях с эстрадиолом относительно контроля без гормонов и после действия прогестерона. Мы выявили также, что YAP располагался в ядрах клеток стромы как после введения эстрадиола, так и прогестерона, причем в условиях с прогестероном его локализация совпадала с CD90. TAZ имел равномерное распределение в клетках стромы у мышей вне зависимости от типа гормонального воздействия.

Таким образом, активность YAP/TAZ является гормон-зависимой в клетках стромы эндометрия. В дополнение к этому мы предполагаем, что CD90⁺ клетки имеют более высокую активность YAP, что говорит о возможной негативной регуляции Hippo-сигналинга в этих клетках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №21-74-30015) <https://www.rscf.ru/project/21-74-30015/>.

Список литературы

1. Gargett C., Schwab K., Deane J. Endometrial stem/progenitor cells: the first 10 years // Hum Reprod Update. 2016. Vol. 22, N 2. P. 137–163. doi: 10.1093/humupd/dmv051
2. Piccolo S., Dupont S., Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond // Physiol Rev. 2014. Vol. 94, N 4. P. 1287–1312. doi: 10.1152/physrev.00005.2014
3. Yu H.-F., Yang Z.-Q., Xu M.-Y., et al. Yap is essential for uterine decidualization through Rrm2/GSH/ROS pathway in response to Bmp2 // Int J Biol Sci. 2022. Vol. 18, N 6. P. 2261–2276. doi: 10.7150/ijbs.67756

Ганцова Е.А.^{1,2} ✉, Вишнякова П.А.^{2,3}, Карягина В.Е.^{2,3}, Мамедов А.Т.⁴, Ельчанинов А.В.^{1–3}

Динамика миграции популяции лейкоцитов при регенерации на мышинной модели резекции печени с предварительной спленэктомией

¹ НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² НИИ молекулярной и клеточной медицины ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

✉ gantsova-ea@rudn.ru

Аннотация. Селезёнка играет важную роль в регуляции регенерации печени после 70% резекции, она является источником мигрирующих в печень лейкоцитов, что в итоге может влиять на печень. С помощью проточной цитометрии установлено, что после резекции в печень мигрируют моноциты, несущие маркеры Ly6C и CD11b.

Ключевые слова: селезенка; печень; регенерация; макрофаги; моноциты.

Gantsova E.A.^{1,2}, Vishnyakova P.A.^{2,3}, Karyagina V.E.^{2,3}, Mamedov A.T.⁴, Elchaninov A.V.^{1–3}

Dynamics of leukocyte population migration during regeneration in a mouse model of liver resection with preliminary splenectomy

¹ Laboratory of Growth and Development, Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

² Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

³ Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Translational Medicine, National Medical Research Centre for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The spleen plays an important role in liver regeneration after 70% resection; it is a source of leukocytes migrating to the liver, which can ultimately affect the liver. Using flow cytometry, it was established that after resection, monocytes carrying Ly6C and CD11b markers migrate to the liver.

Keywords: spleen; liver; regeneration; macrophages; monocytes.

Регенерация печени млекопитающих является сложным процессом, в регуляцию которого вовлечено множество механизмов. Иммунная система оказывает выраженное влияние на течение репаративных процессов у млекопитающих. Существует прямая анатомическая связь между печенью и селезенкой, крупнейшим лимфоидным органом у млекопитающих, через систему портальной вены. Это дает основания полагать, что селезенка влияет на регенерацию печени путем выделения биологически активных веществ и миграции лейкоцитов. Однако конкретные механизмы этого воздействия пока малоизучены. Цель исследования — изучить влияние спленэктомии на регенерацию печени после 70% резекции на модели у мышей.

Воспроизведена модель регенерации печени после 70% резекции у половозрелых самцов C57BL/6, у части животных за 7 дней до резекции печени выполнена спленэктомия. Методом проточной цитометрии изучена динамика Ly6C⁺ моноцитов и Ly6G⁺ лейкоцитов.

Спленэктомия оказывает выраженное влияние на состояние лейкоцитарной, в том числе моноцитарно-макрофагальной системы печени. Это влияние заметно именно при регенерации печени. Установлено, что после резекции в печень мигрирует большое число моноцитов, несущих маркеры Ly6C и CD11b. У животных с предварительной спленэктомией число мигрирующих моноцитов оказалось значительно меньше. Число CD11b⁺ клеток у животных со спленэктомией было значительно меньше после резекции печени через 24 и 72 ч, на 7-е сутки — различий не было. Статистически значимая разница числа Ly6C⁺ клеток обнаружена только через 72 ч после резекции печени, при этом у животных со спленэктомией этих клеток было значительно меньше. Интересно отметить, что резекция печени вызывала снижение числа F4/80⁺ клеток в общей фракции стромальных клеток печени. Это наблюдалось как у животных со спленэктомией, так и без нее. Обнаружено, что предварительное удаление селезенки приводит к снижению миграции Ly6G⁺ лейкоцитов в регенерирующую печень. Статистически значимые различия обнаружены через 24 ч после резекции печени.

Долгое время наличие миграции лейкоцитов в резецированную печень оставалось спорным. Затем стали накапливаться данные о миграции в печень гранулоцитов, лимфоцитов и моноцитов. В настоящей работе нами также получены данные о миграции в регенерирующую печень Ly6C⁺ CD11⁺ моноцитов, а также Ly6G⁺ гранулоцитов. Ранее нами установлено, что резекция печени приводит к уменьшению числа макрофагов, моноцитов и лимфоцитов в селезенке [1, 2]. С этим согласуются данные о том, что удаление селезенки приводит к замедлению процессов лейкоцитарной инфильтрации печени. При этом в макрофагах печени активизируются сигнальные пути, связанные с фокальной адгезией [3, 4]. Особенно это характерно для 1-х суток регенерации, далее отмечается активация сигнальных путей, связанных с воспалением. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет сделать вывод, что мигрирующие в печень лейкоциты предварительно накапливаются в селезенке. Селезенка оказывает заметное влияние на регенерацию печени путем секреции биологически активных веществ, а также с помощью мигрирующих лейкоцитов. Предварительная спленэктомия приводит к более выраженному повреждению печени после ее 70% резекции, что выражается в более высоком уровне клеточной пролиферации, активации сигнальных путей, связанных с клеточной гибелью. Однако более тяжелое повреждение компенсируется, что в конечном итоге приводит к восстановлению исходной массы печени.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00152).

Список литературы

1. Elchaninov A., Nikitina M., Vishnyakova P., et al. Macro- and microtranscriptomic evidence of the monocyte recruitment to regenerating liver after partial hepatectomy in mouse model // *Biomed Pharmacother.* 2021. Vol. 138. ID 111516. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111516
2. Elchaninov A., Vishnyakova P., Kuznetsova M., et al. The spleen as a possible source of serine protease inhibitors and migrating monocytes required for liver regeneration after 70% resection in mice // *Front Cell Dev Biol.* 2023. Vol. 11. ID 1241819. doi: 10.3389/fcell.2023.1241819
3. Swirski F.K., Nahrendorf M., Etzrodt M., et al. Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites // *Science.* 2009. Vol. 325, N 5940. P. 612–616. doi: 10.1126/science.1175202
4. Michalopoulos G.K. Advances in liver regeneration // *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014. Vol. 8, N 8. P. 897–907. doi: 10.1586/17474124.2014.934358

Гетманова Т.Е.✉, Адешелидзе С.Р., Диденко Н.Н., Гатило Ю.Ю.

Применение биомедицинских клеточных продуктов для торможения пролиферации клеток меланомы человека *in vitro*

Ставропольский государственный медицинский университет, Ставрополь, Россия

✉ tgetmanova734@gmail.com

Аннотация. В эксперименте показано, что секретом МСК оказывает селективный цитопротективный эффект по отношению к линейным фибробластам, но не клеткам меланомы. Полученные данные дают основание для продолжения исследований возможности применения β -дефензина в сочетании с БМКП в лечении меланомы.

Ключевые слова: стволовая клетка; секретом; меланома; дефензин; биомедицинские клеточные препараты.

Getmanova T.E., Adeshelidze S.R., Didenko N.N., Gatilo Yu.Yu.

Application of biomedical cell products to inhibit human melanoma cell proliferation *in vitro*

Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. The experiment showed that the MSC secretome has a selective cytoprotective effect against linear fibroblasts, but not melanoma cells. The data obtained provide grounds for continuing research into the possibility of using β -defensin in combination with BMCP in the treatment of melanoma.

Keywords: stem cell; secretom; melanoma; defensin; biomedical cell products.

Меланома — злокачественная опухоль нейроэктодермального происхождения, развивающаяся из меланоцитов. В мире заболеваемость меланомой кожи постоянно растет, что объясняется постоянным увеличением суммарного воздействия УФ-спектра солнечного света на человека, генетически к этому не подготовленного [1]. Инвазивная меланома кожи — это пятая по частоте злокачественная опухоль у мужчин и шестая самая частая опухоль у женщин, что составляет около 5% всех впервые выявленных случаев злокачественных опухолей. Средний возраст пациентов с диагнозом ЗМК — 65,9 лет, в 2020 г. В России было зарегистрировано 27 случаев меланомы у пациентов в возрасте до 20 лет, 5 из которых закончились летальным исходом [2]. При этом, согласно имеющимся отчетным формам, в 2019 г. 87,2% пациентов с меланомой кожи (среди тех, кто подлежал радикальному лечению) получили только хирургическое лечение. Что подтверждает необходимость разработки новых подходов к терапии меланомы.

Дефензины — антимикробные пептиды иммунной системы, обладающие антибактериальной, противовирусной, противогрибковой активностью, а также иммуномодулирующим, противоопухолевым и ранозаживляющим действием. Рекомбинантный человеческий дефензин DEFb103A обладает неспецифическим цитотоксическим действием.

Мы предполагаем разработать новый экспериментальный метод применения биомедицинских клеточных препаратов (БМКП) в целях снижения неспецифического цитотоксического действия рекомбинантного β -дефензина для расширения возможности его использования в лечении меланомы.

Материалы и методы. Первичные культуры МСК жировой ткани мыши получали путем ферментативной диссоциации коллагеназой (200 ЕД/мл, 37°C, 2 ч) и культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (Gibco) в культуральных флаконах площадью 25 см² (ThermoScientific) при 37 °C и 5% CO₂. Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения

80–90% конфлюэнтности монослоя клетки отделяли с помощью 0,25% раствора трипсина (БиолоТ) и 0,02% раствора Версена (БиолоТ) в соотношении 1:1 и подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Luna-FL (LogosBiosystems). В эксперименте использовались клетки на 3-м пассаже.

Для получения секрета на 3-м пассаже некоммитированные МСК трехкратно промывали стерильным раствором фосфатного буфера, центрифугируя 5 мин при 300 g и комнатной температуре между промывками, после чего вносили по 10^6 живых клеток в 500 мкл фосфатного буфера в лунки 24-луночного планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре 24 ч, после чего супернатант аспирировали, фильтровали с использованием шприцевого фильтра с диаметром пор 0,2 мкм и центрифугировали 20 мин при 2000 g.

Для проведения исследования клетки меланомы человека линии SK-MEL-2 и эмбриональные фибробласты мыши СЗНА высаживали по 5×10^4 живых клеток в лунки 24-луночного планшета в следующих условиях:

– 1-я группа ($n = 4$ повторения для каждой линии) — в 500 мкл среды Игла MEM (БиолоТ) с добавлением 10% FBS для клеток меланомы и 500 мкл среды BME (БиолоТ) с добавлением 10% FBS для фибробластов (положительный контроль);

– 2-я группа ($n = 4$ повторения для каждой линии) — в 500 мкл соответствующей среды с добавлением 20 мкг/мл рекомбинантного человеческого дефензина DEFb103A (Cloud-CloneCorp.) (DEF);

– 3-я группа ($n = 4$ повторения для каждой линии) — в 500 мкл соответствующей среды с добавлением 20 мкг/мл дефензина и 10 мг/мл секрета МСК (DEF+EVs).

Планшет с пробамы помещали на ночь (16 ч) в инкубатор при 37°C и 5% CO₂.

На следующий день для определения жизнеспособности клеток в опытных и контрольной группах использовали набор реактивов EZ4U (модификация теста МТТ). Осуществляли смену среды на 450 мкл свежей среды, вносили по 50 мкл активированного раствора EZ4U на лунку и инкубировали планшеты в течение 2 ч при 37°C.

Оптическую плотность раствора в лунках планшета измеряли при длине волны 450 нм, вычитая величину оптической плотности при 620 нм как фоновую, с помощью многофункционального фотометра-имиджера Cytation 1 и выражали в % относительно положительного контроля.

Результаты. При добавлении в среду только дефензина (группа DEF) жизнеспособность клеток была достоверно ниже контроля и составляла 59,4% и 57,3% для SK-MEL-2 и фибробластов соответственно. При одновременном введении секрета МСК цитотоксический эффект дефензина в отношении клеток меланомы сохранился (65,2%), в то время как жизнеспособность фибробластов составляла 93,1% от контроля и достоверно от него не отличалась.

Заключение. Эксперимент показал, что рекомбинантный β-дефензин в концентрации 20 мкг/мл оказывает цитотоксическое действие в отношении как линейных фибробластов, так и клеток меланомы человека. Однако добавленный в среду секретом МСК оказывает селективный цитопротективный эффект по отношению к линейным фибробластам. Полученные данные дают основание для продолжения исследований возможности применения β-дефензина в сочетании с БМКП в лечении меланомы.

Список литературы

1. Давыдов М.И., Ганцев Ш.Х. Онкология: учебник. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2020. 920 с.
2. Ассоциация специалистов по проблемам меланомы, Ассоциация онкологов России, Российское общество клинической онкологии. Меланома кожи и слизистых оболочек. Клинические рекомендации. Москва, 2023. 139 с.

Гилевич И.В.^{1,2} ✉, Поляков И.С.^{1,2}, Порханов В.А.^{1,2}, Коваленко А.Л.¹, Орлов С.В.³, Карал-Оглы Д.Д.³

Экспериментальное обоснование способа клеточной терапии в торакальной хирургии

¹ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница №1 им. проф. 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

✉ giliv@list.ru

Аннотация. Несостоятельность бронхиальных швов является грозным осложнением операций на легких. Существующие методы направлены на лечение и малоэффективны. Более эффективно было бы предупредить развитие осложнения. С этой целью нами разработан способ для профилактики возникновения бронхиальных свищей.

Ключевые слова: фибробласты; лизат тромбоцитов; бронхиальный свищ; клеточная терапия.

Gilovich I.V.^{1,2}, Polyakov I.S.^{1,2}, Porhabov V.A.^{1,2}, Kovalenko A.L.¹, Orlov S.V.³, Karal-Ogly D.D.³

Experimental conformayion of cell therapy during thoracic surgery

¹ Research Institute — Regional Clinical Hospital No. 1 named after Prof. S.V. Ochapovsky, Krasnodar, Russia

² Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

³ SRI Medical Primatology, Sochi, Russia

Abstract. Bronchial fistula is a serious complication of lung surgery. Current methods are aimed to treatment the failure and have poor effectiveness. It would be more effective to prevent the development of complications. For this purpose, we have developed a method for preventing the occurrence of bronchial fistulas.

Keywords: fibroblasts; platelet lysate; bronchial fistula; cell therapy.

Наиболее частой причиной возникновения бронхиальных свищей (БС) являются открытые операции на легком, как правило, пневмонэктомия. Несмотря на то, что это редкое послеоперационное осложнение, оно приводит к серьезным последствиям, таким как эмпиема плевры, пневмония единственного легкого и летальный исход [1–3].

Основной патогенетический вариант развития свищей заключается в нарушении местного кровоснабжения и ишемическом некрозе стенки бронха. Клеточная терапия, в основе которой лежит стимуляция регенеративных процессов, в том числе и неоангиогенеза, должна будет оказывать положительный эффект на заживление культи бронха [4].

Цель исследования — оценить влияние клеточного препарата на регенерацию поврежденной ткани верхних дыхательных путей в эксперименте на нечеловекообразных приматах.

Исследование было выполнено на 22 приматах вида *pario apubis*, мужского пола, средним возрастом 11,6±5,0 лет. Приматов выводили из эксперимента на 3, 7, 14, 21-е сутки и через 6 месяцев после операции. Животные были разделены на 2 группы: опытная (клеточный препарат) и контрольная (раствор NaCl 0,9%). Весь период эксперимента приматы содержались в индивидуальных клетках. В периоперационном периоде был выполнен иммуноферментный (ИФА) анализ медиаторов периферической крови (ПК): VEGF, IL-4, IL-6, IL-10, MMP-2, PDGF. После выведения животных из эксперимента проводили гистологический анализ аутопсийного материала.

Клеточный препарат состоял из 2 компонентов. Первый компонент — это ксеногенные дермальные фибробласты человека, 4 пассаж, полученные из криобанка лаборатории. Для однократного введения было использовано 6 млн клеток в 2 мл. Для получения второго компонента, лизата тромбоцитов, за 3 дня до эксперимента у приматов забирали ПК, выделяли плазму, обогащенную тромбоцитами, после чего её подвергали циклу заморозки на -80°C — и разморозки $+37^{\circ}\text{C}$ с последующим центрифугированием для осаждения тромбоцитов. Лизат тромбоцитов был использован в объеме 2 мл.

Для создания модели оперативного вмешательства на главных бронхах у приматов была выполнена пневмонэктомия. Под общим наркозом после пневмонэктомии и формирования культи главного бронха в края дефекта вводили клеточный препарат общим объемом 4 мл.

В интра- и постоперационном периоде не было зафиксировано ни одного случая инфекционных осложнений и летальности. В течение 6 месяцев наблюдения за животными физиологические параметры, такие как частота дыхания, сердечный ритм и температура, были в пределах нормы. За весь период наблюдения отсутствовали клинические признаки аллергических реакций, гнойно-воспалительные изменения, токсические реакции, что было подтверждено гистологически.

Результаты морфологического анализа показали в опытной группе стимуляцию клеточной пролиферации и ускоренный синтез коллагена в области культи бронха, начиная с 7-х суток. При этом стихание признаков воспалительной реакции наблюдалось в более ранние сутки по сравнению с контрольной группой. В контрольной группе признаки лимфо-макрофагальной инфильтрации, нарушение микроциркуляции сохранялись на 14-е сутки. В опытной группе уже на 14-е сутки была сформирована рубцовая ткань, покрытая дифференцированным эпителием, в то время как в контрольной группе это было отмечено на 21-е сутки, при этом сохранялся незначительный инфильтрат. При наблюдении через 6 месяцев была сформирована плотная рубцовая ткань, покрытая многорядным мерцательным эпителием, отсутствовали признаки метаплазии. Полученные результаты свидетельствовали об отсутствии тканевой и системной токсичности, а также иммунологической реакции.

Результаты ИФА-анализа также продемонстрировали раннее нивелирование системных воспалительных реакций в виде снижения IL-4, IL-6, IL-10, MMP-2 и повышение таких факторов роста, как VEGF, PDGF в опытной группе.

Таким образом, была показана тканевая биосовместимость клеточного препарата, отсутствие токсических и иммунологических реакций и его эффективность для профилактики развития несостоятельности бронхиальных швов.

Список литературы

1. Lopez-Pastorini A., Eckermann C., Koryllos A., et al. Clinical and bronchoscopic aspects of bronchial healing after sleeve resection for lung cancer: a multivariate analysis on 541 cases // *J Thorac Dis.* 2022. Vol. 14, N 4. P. 927–938. doi: 10.21037/jtd-21-1627
2. Порханов В.А., Поляков И.С., Кононенко В.Б., и др. Трансстернальная окклюзия свища главного бронха после пневмонэктомии // *Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова.* 2020. № 10. С. 11–22. EDN: BVBEMB doi: 10.17116/hirurgia202010111
3. Petrella F., Spaggiari L. Stem cells application in thoracic surgery: current perspective and future directions. В кн.: Turksen K., editor. *Cell biology and translational medicine.* Vol. 2. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol. 1089. Springer, Cham. 2018. P. 143–147. doi: 10.1007/5584_2018_180
4. Trivisonno A., Nachira D., Boškoski I., et al. Regenerative medicine approaches for the management of respiratory tract fistulas // *Stem Cell Res Ther.* 2020. Vol. 11, N 1. ID 451. doi: 10.1186/s13287-020-01968-1

Гилевич И.В.¹ ✉, Ираклионова Н.С.¹, Коломийцева Е.А.¹, Глазков И.С.², Толмачева Ю.И.², Зозуля Л.В.²

Оптимизация условий культивирования дермальных фибробластов с целью создания биобанка аллогенных фибробластов

¹ ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» МЗ КК, Краснодар, Россия

² ФГБОУ ВО «Кубанский государственный университет», Краснодар, Россия

✉ giliv@list.ru

Аннотация. При культивировании клеток наиболее часто в качестве саплимента в составе полной питательной среды выступает фетальная бычья сыворотка. Однако ее использование при производстве биомедицинских клеточных продуктов невозможно, что создает необходимость в поиске оптимального аналога.

Ключевые слова: фибробласты; культивирование; фетальная бычья сыворотка; свежемороженая плазма; криосупернатант.

Gilevich I.V.¹, Iraklionova N.S.¹, Kolomiytceva E.A.¹, Glazkov I.S.², Tolmacheva Yu.I.², Zozulya L.V.²

Optimization of dermal fibroblasts cultivation conditions for the purpose of biobanking of allogeneic fibroblasts

¹ Research Institute — Regional Clinical Hospital No. 1 named after Prof. S.V. Ochapovsky, Krasnodar, Russia

² Kuban State University, Krasnodar, Russia

Abstract. Fetal bovine serum is most often used as a supplement in the composition of cell culture medium. However, its use in the production of biomedical cell products is impossible, which creates the need to find the optimal analogue.

Keywords: fibroblasts; cultivation; fetal bovine serum; fresh frozen plasma; cryosupernatant.

Одним из направлений регенеративной медицины как активно развивающейся области является применение биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для терапии заболеваний различной этиологии. В практике показаны результаты применения культивированных дермальных фибробластов для лечения ряда заболеваний [1, 2]. Способность фибробластов формировать экстрацеллюлярный матрикс, синтезировать цитокины, вызывать миграцию и пролиферацию разных типов клеток (эпителиальных, эндотелиальных, клеток волосяных фолликулов) при повреждениях делает их перспективными для широкого клинического применения. Помимо этого, культивированные фибробласты сохраняют диплоидный набор хромосом, имеют ограниченную продолжительность жизни, то есть не способны к иммортализации, не экспрессируют антигены главного комплекса гистосовместимости II класса, не проявляют онкогенных свойств [3].

Культивирование фибробластов с целью получения БМКП и дальнейшего хранения в биобанке является одним из этапов технологического процесса производства клеточного продукта. Выбор правильных условий обеспечивает качество получаемого продукта. На пролиферативную активность фибробластов оказывает влияние способ культивирования, тип питательных сред и сывороток. Используемый саплимент в составе полной питательной среды (ППС) должен соответствовать требованиям инфекционной безопасности, обеспечивать жизнеспособность, низкий апоптотический индекс, сохранять функциональные свойства клеток и не вызывать аллергических реакций. Отсутствие стандартизованных условий культивирования, а также ксеногенное происхождение фетальной бычьей сыворотки (ФБС) обуславливает необходимость поиска оптимального саплимента для культивирования фибробластов.

Цель исследования — оптимизация условий культивирования дермальных фибробластов с использованием различных саплиментов в составе ППС.

В ходе исследования была проведена сравнительная оценка влияния различных саплиментов к питательной среде на морфофункциональные характеристики клеточной линии дермальных фибробластов 5 пассажа. Пролиферативную активность оценивали по времени удвоения популяции клеток (M, SD), для оценки цитотоксичности саплиментов в составе ППС применяли ХТТ-тест (PanReac Appli Chem, США).

Для приготовления 10% ППС для культивирования фибробластов использовали DMEM (Elabscience, США) и следующие саплименты: 1) ФБС (BioScience, Израиль) — контрольная группа (КГ); 2) донорскую свежемороженную плазму АВ группы (СЗП) — опытная группа №1 (ОГ1); 3) криосупернатант из СЗП — опытная группа №2 (ОГ2).

В ходе культивирования клетки во всех группах сохраняли типичную для дермальных фибробластов морфологию. Время достижения 90% конфлюентности в КГ составило 7 суток, в ОГ1 — 9 суток, в ОГ2 — 8 суток.

Время удвоения популяции клеток в КГ составило $65,36 \pm 7,04$ ч. Для ОГ1 данный показатель был равен $94,28 \pm 2,26$ ч, в то время как для ОГ2 — $69,43 \pm 3,42$ ч. Между группами ОГ1 и КГ, группами ОГ1 и ОГ2 была выявлена статистически значимая разница ($p < 0,05$), при этом достоверные различия между группами КГ и ОГ2 отсутствовали. Несмотря на то, что процесс культивирования при использовании криосупернатанта в качестве саплимента занял больше времени, чем при использовании классической фетальной бычьей сыворотки, культура фибробластов также имела высокую пролиферативную активность.

При оценке метаболической активности клеток с помощью ХТТ-теста было выявлено сохранение активности клеток в обеих группах: для ОГ1 — 89,66%, для ОГ2 — 86,42%, что свидетельствовало об отсутствии цитотоксического воздействия примененных саплиментов на фибробласты.

Полученные результаты позволяют предположить, что использование донорских плазменных компонентов является альтернативой ксеногенным саплиментам. По нашему мнению, предпочтительнее использовать криосупернатант, так как он содержит редуцированное количество факторов свертывания по сравнению с СЗП, что будет препятствовать возможной активации системы гемостаза *in vitro*.

Список литературы

1. Вагнер Д.О., Зиновьев Е.В., Крылов К.М., и др. Опыт клинического применения аллогенных фибробластов у пострадавших с обширными ожогами кожи // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. 2018. Т. 10, № 3. С. 65–72. EDN: VNNZIV doi: 10.17816/mechnikov201810365-72
2. Поляков И.С., Порханов В.А., Коваленко А.Л., и др. Возможности клеточной терапии в торакальной хирургии // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова. 2023. Т. 30, № 1. С. 27–36. EDN: OI DRBY doi: 10.24884/1607-4181-2023-30-1-27-36
3. Koudan E.V., Zorina A.I., Levin A.A., et al. Correlation of the regenerative potential of dermal fibroblasts in 2D culture with the biological properties of fibroblast-derived tissue spheroids // Cell Tissue Res. 2022. Vol. 390. P. 453–464. doi: 10.1007/s00441-022-03690-1

Гилязова А.Н. ✉, Усанова А.П., Волошин С.Ю., Истранова Е.В., Тимашев П.С., Антошин А.А.

Оптически прозрачные коллагеновые мембраны, полученные методом электрофоретического осаждения, для применения в офтальмологии

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

✉ gilyazova_a_n@staff.sechenov.ru

Аннотация. В ходе данного исследования разрабатываются оптически прозрачные мембраны на основе коллагена, получаемые методом электрофоретического осаждения. Данные мембраны обладают прозрачностью, сопоставимой с нативной роговицей, что позволяет создать эффективную альтернативу пересадке донорской роговицы.

Ключевые слова: регенерация; коллаген; искусственная роговица; коллагеновые биоматериалы; регенеративная медицина; тканевая инженерия.

Gilyazova A.N., Usanova A.P., Voloshin S.Y., Istranova E.V., Timashev P.S., Antoshin A.A.

Application of optically transparent collagen membranes obtained by electrophoretic deposition in ophthalmology

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. This study focuses on developing optically transparent collagen-based membranes obtained by the electrophoretic deposition. This material has transparency comparable to native cornea, providing an effective alternative to donor cornea transplantation.

Keywords: regeneration; collagen; artificial cornea; collagen biomaterials; regenerative medicine; tissue engineering.

В современном мире с каждым годом возрастает распространённость заболеваний роговицы, которые могут приводить к слепоте. В большинстве случаев зрение возможно сохранить, однако несвоевременное обращение за медицинской помощью и длительное ожидание трансплантации донорской роговицы приводят к неутешительным последствиям. На сегодняшний день главной стратегией лечения пациентов с данной патологией является пересадка роговицы. Однако основной проблемой остается нехватка донорских органов, в связи с чем только 1 из 70 пациентов получает должное лечение, в то время как у остальных прогрессирует течение заболевания, приводя к необратимым изменениям роговицы.

Целью данного исследования является создание прозрачной и механически прочной мембраны из коллагена, которая по своим физико-химическим и оптическим свойствам будет сопоставима с нативной роговицей.

Мембраны получали при помощи электрофоретического осаждения. Для этого выделяли суспензию коллагена, полученную из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота, которую подвергали обработке пепсином и растворяли в 0,5 М уксусной кислоты. Конечную форму прозрачной мембраны получали за счёт химической сшивки разными кросс-линкерами (глутаральдегид, карбодиимид).

Оценку прозрачности коллагеновых мембран проводили методом спектрофотометрии (Multiskan SkyHigh, Thermo FS, США) в режиме конечного поглощения на длине волны 530 нм, измерения проводили 3 раза.

Механические свойства полученных матриц тестировали во влажных условиях с использованием системы макромеханических испытаний Mach-1 v500csst (Biomomentum Inc., Лаваль, Квебек, Канада). Тестирование влажных образцов проводили после инкубации в течение 24 часов в фосфатно-солевом буфере при 4°C.

При исследовании коллагеновых мембран было обнаружено, что прозрачность зависит от типа сшивающего агента. Так, сшивка карбодиимидом дала наиболее высокий результат на 1, 3 и 7-й дни после её смачивания в фосфатно-солевом буфере. Среднее значение прозрачности мембран, сшитых карбодиимидом, на протяжении всего периода проведения эксперимента составило 86%, что являлось значимо выше ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой (56%) и группой мембран, сшитых глутаральдегидом (77%).

При исследовании механических свойств коллагеновых мембран, сшитых карбодиимидом, растяжение на разрыв составило около 20%, что по сравнению с группой мембран, сшитых глутаральдегидом (88%), и с группой контроля (96%) оказалось значительно ниже ($p < 0,05$).

Таким образом, для достижения необходимой прозрачности наиболее эффективным кросс-линкером оказался карбодиимид. Его кросс-линкерные свойства позволяют не только достичь нужных значений, но и сохраняют прозрачность на протяжении всего периода эксперимента.

Гладких Д.А.¹ ✉, Дроздова М.Г.², Толстова Т.В.³, Сажнев Н.А.⁴, Усвалиев А.Д.⁵, Веселов М.М.⁵, Кильдеева Н.Р.⁴, Клячко Н.Л.⁵, Марквичева Е.А.²

Композитные хитозан/фиброиновые матрицы, содержащие магнитные наночастицы, для тканевой инженерии

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

² ГНЦ Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина–Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

⁴ Российский государственный университет им. А.Н. Косыгина (Технология. Дизайн. Искусство), Москва, Россия

⁵ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ daria_gladkikh2k2@mail.ru

Аннотация. Содержащие магнитные наночастицы композитные матрицы хитозана/фиброина поддерживали адгезию (конфокальная лазерная микроскопия) и пролиферацию клеток (МТТ-тест). Воздействие магнитного поля приводило к секреции иммуномодулирующих цитокинов (ИФА) и активации генов, участвующих в остеогенезе (ПЦР-РВ).

Ключевые слова: макропористые матрицы; пленки; хитозан; фиброин; магнитные наночастицы; тканевая инженерия.

Gladkikh D.A.¹, Drozdova M.G.², Tolstova T.V.³, Sazhnev N.A.⁴, Usvaliev A.D.⁵, Veselov M.M.⁵, Kildeeva N.R.⁴, Klyachko N.L.⁵, Markvicheva E.A.²

Composite chitosan/fibroin matrices loaded with magnetic nanoparticles for tissue engineering

¹ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

² Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

⁴ Kosygin State University of Russia (Technology. Design. Art), Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Composite chitosan/fibroin matrices containing magnetic nanoparticles supported cell adhesion (confocal laser microscopy) and proliferation (MTT test). Exposure to a magnetic field resulted in secretion of immunomodulatory cytokines (ELISA) and activation of genes involved in osteogenesis (RT-PCR).

Keywords: macroporous matrices; films; chitosan; fibroin; magnetic nanoparticles; tissue engineering.

Выбор материалов для создания матриц определяется особенностями строения и функций поврежденной ткани, т.к. некоторые ткани требуют особых физических или химических факторов. Например, для регенерации мышечной, костной, нервной и сердечной тканей, благодаря их способности производить электрические биосигналы, важными являются физические свойства материала, такие как механическое растяжение, электрический заряд и проводимость в магнитных полях [1]. Поэтому биodeградируемые матрицы, содержащие магнитные наночастицы, имеют большой потенциал в тканевой инженерии. Показано, что культивирование клеток на таких матрицах, загруженных наночастицами магнетита (Fe_3O_4), способствовало увеличению пролиферации и дифференцировки остеобластов и стволовых клеток костного мозга [2]. С другой стороны, показано, что воздействие магнитного поля на клетки, культивируемые на матрицах с магнитными наночастицами, может приводить к увеличению активности щелочной фосфатазы, что свидетельствует об ускорении регенерации костной ткани [3].

Целью данной работы было получение различных матриц на основе смеси хитозана и фиброина, содержащих наночастицы магнетита различной формы, и изучение пролиферации/дифференцировки клеток, в том числе при воздействии низкочастотного магнитного поля.

Матрицы, сшитые дженипином, содержащие магнитные наночастицы (2–10% масс), получали из смеси хитозана с фиброином (1:1 w/w). В работе изучали различные типы матриц, в частности двумерные (2D) пленки и трехмерные (3D) макропористые гидрогели. Пленки формовали методом полива, а макропористые гидрогели получали методом криоструктурирования. Матрицы без магнитных наночастиц использовали в качестве контроля.

Цитотоксичность изучали методом тестирования экстрактов, в которых культивировали клетки мышинных фибробластов (L929) в течение 24 ч. Экстракты были получены после инкубации матриц в среде культивирования DMEM в течение 24 ч. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью МТТ-теста. Было показано, что полученные матрицы не цитотоксичны.

Также изучали возможность использования матриц, нагруженных магнитными наночастицами, для длительного культивирования клеток. В качестве модельных использовали модельные клетки мышинных фибробластов линии L929, феохромоцитомы крысы линии PC12, а также мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из жировой ткани человека (МСК). Клетки засеивали на матрицы и культивировали в течение 7 дней. Было показано, что все полученные матрицы поддерживали адгезию, рост и пролиферацию клеток при их длительном культивировании *in vitro*. С помощью конфокальной лазерной микроскопии было показано, что матрицы, содержащие магнитные наночастицы, поддерживали адгезию клеток и способствовали расплыванию мышинных фибробластов L929 и МСК. С использованием МТТ-теста была проведена количественная оценка жизнеспособности мышинных фибробластов L929 и феохромоцитомы крысы PC12, растущих в матрицах. Было обнаружено, что матрицы, нагруженные наночастицами магнетита, поддерживали рост и пролиферацию клеток линий L929 и PC12.

Кроме того, изучали воздействие магнитного поля (19/53 Гц, 100 мТл, по 1 ч/день) в течение 5 дней на МСК, засеянные на пленки, нагруженные магнитными наночастицами. Клетки, культивируемые на пленках без воздействия магнитного поля, использовали в качестве контроля. Было показано, что такое воздействие магнитного поля на клетки, культивируемые на пленках, модулировало секреторную активность и транскрипционный профиль клеток. Так, согласно результатам иммуноферментного анализа и ПЦР в реальном времени было подтверждено изменение уровня провоспалительных цитокинов (IL-6, TNF- α), а также экспрессии маркеров остеогенеза (*Alpl*, *RUNX2*).

Таким образом, полученные пленки и макропористые гидрогели, содержащие магнитные наночастицы, могут быть предложены для разработки магнитоуправляемых матриц для тканевой инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 22-13-00261). В работе использовано оборудование, купленное в том числе по Программе Развития МГУ.

Список литературы

1. Kong L., Gao X., Qian Y., et al. Biomechanical microenvironment in peripheral nerve regeneration: from pathophysiological understanding to tissue engineering development // *Theranostics*. 2022. Vol. 12, N 11. P. 4993–5014. doi: 10.7150/thno.74571
2. Li Z., Xue L., Wang P., et al. Biological scaffolds assembled with magnetic nanoparticles for bone tissue engineering: A review // *Materials* (Basel). 2023. Vol. 16, N 4. 1429. doi: 10.3390/ma16041429
3. Habib M., Horne D.A., Hussein K., et al. Magnetic nanoparticles synergize with pulsed magnetic fields to stimulate osteogenesis in vitro // *Tissue Eng Part A*. 2021. Vol. 27, N 5–6. P. 402–412. doi: 10.1089/ten.TEA.2020.0102

Говорова И.А. ✉, Новикова Ю.А., Никиточкина С.Ю., Сутягина О.И., Воротеляк Е.А.

Фармакологическая активация Hippo/YAP сигналинга способствует дифференцировке альвеолярного эпителия и сокращению доли PDGFR α ⁺ мезенхимы легких

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

✉ ischenko.i.a@gmail.com

Аннотация. Исследование Hippo сигнального пути и его взаимодействия с другими сигналингами в клетках легких важно для понимания механизмов развития, регенерации и патогенеза. Показано, что фармакологическая модуляция Hippo пути оказывает влияние на IL6/JAK/STAT путь и на дифференцировку альвеолоцитов 2-го типа (AT2).

Ключевые слова: Hippo; YAP/TAZ; IL6/JAK/STAT; вертепорфин; TRULI; легкие.

Govorova I.A., Novikova Y.A., Nikitochkina S.Y., Sutyagina O.I., Vorotelyak E.A.

Pharmacological activation of Hippo/YAP signaling promotes alveolar epithelium differentiation and reduces PDGFR α ⁺ mesenchyme in lungs

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Studying Hippo signaling and its intersignaling crosstalk is pivotally important for understanding the development, regeneration and pathogenesis mechanisms in lung cells. Hippo pathway pharmacological modulation was shown to result in IL6/JAK/STAT pathway inhibition and AT2 cell differentiation.

Keywords: Hippo; YAP/TAZ; IL6/JAK/STAT; verteporfin; TRULI; lungs.

В клетках дыхательной системы Hippo и IL-6/JAK/STAT сигнальные пути играют важную роль как в норме, участвуя в процессах гомеостаза и регенерации ткани, так и при различных патологиях [1, 2]. Нарушение регуляции Hippo сигналинга в дыхательной системе приводит к таким заболеваниям, как идиопатический легочный фиброз, астма, хроническая обструктивная болезнь легких, бронхит, пневмония, легочная артериальная гипертензия, рак легких и другие [3]. При этом отклонения в IL-6/JAK/STAT пути в клетках легких приводят к прогрессированию рака, воспалению и аутоиммунным патологиям [4]. Известно, что Hippo сигналинг активно вовлечен во взаимную межсигнальную регуляцию [5], однако в настоящее время мало изучены механизмы взаимной регуляции Hippo и IL-6/JAK/STAT путей. В представленной работе на модели органоидов легких мыши выявлено влияние модуляции Hippo на IL-6/JAK/STAT путь в клетках мезенхимы легких. При этом показано, что как активация, так и деактивация YAP в органоидах посредством фармакологических ингибиторов негативно регулирует IL-6/JAK/STAT путь в мезенхиме легких. Кроме того, показана критическая роль модуляции Hippo-YAP пути для дифференцировки прогениторных клеток альвеолярного эпителия легких.

В работе использованы легочные органоиды (EpCam⁺/EpCam⁻), состоящие из тотальной фракции клеток легких мыши, а также модель альвеолярных органоидов (EpCam⁺Sca1⁻/EpCam⁻), эпителий которых состоял из прогениторных альвеолоцитов (AT2). Клетки выделяли из легких половозрелых мышей P30 линии C57Bl/6. Легкие были перфузированы и интратрахеально заполнены диспазой (50U/ml). После измельчения, ткани инкубировали с коллагеназой IV типа (1000 U/ml) и 0,0025% ДНКазы. Далее путём магнитного сортирования удаляли клетки крови (CD45⁺) и эндотелия (CD31⁺). Для получения легочных органоидов клеточную суспензию сочетали с матригелем без факторов роста (1:1) и вносили во вставки Transwell (0,4 мкм).

Для получения альвеолярных органоидов CD45-CD31- фракцию, содержащую клетки эпителия и мезенхимы, окрашивали антителами против EpCAM и антигена стволовых клеток Sca1. Путём флуоресцентного сортирования были изолированы EpCAM+Sca1- и EpCAM- фракции клеток, которые также сочетались с матригелем во вставках для культивирования. Легочные и альвеолярные органоиды культивировали в течение 14 сут в среде (DMEM/F-12, 10% FBS, 1% GlutaMax, 1% PenStrep, 1% ITS-X, 1% HEPES). В качестве модуляторов Hippo/YAP сигналинга были выбраны вертепорфин (VTP, Sigma) (1 мкМ) и TRULI (The Rockefeller University Lats Inhibitor) (10 мкМ), не цитотоксические концентрации ингибиторов определены с помощью МТТ теста. Органоиды культивировались в присутствии модуляторов в течение 5 сут.

Биоинформатический анализ дифференциально экспрессируемых генов полного РНК-секвенирования органоидов в контрольной среде и в присутствии ингибиторов выявил четкое разделение по экспериментальным образцам кластеров экспрессируемых генов. РНК-секвенирование альвеолярных органоидов в присутствии VTP и TRULI показало статистически значимое ингибирование сигнатуры IL-6/JAK/STAT сигнального пути. Причем подавление IL-6/JAK/STAT происходит как при активации (TRULI), так и при ингибировании (VTP) Hippo/YAP сигналинга. Анализ транскриптома единичных клеток легочных органоидов (контроль и TRULI) выявил, что при воздействии TRULI значимо подавляется экспрессия генов IL-6/JAK/STAT сигнального пути непосредственно в мезенхиме легких мыши, при этом не выявлено изменений в регуляции IL-6/JAK/STAT сигнального пути в эпителии при воздействии TRULI. Кроме того, на модели легочных органоидов верифицирован YAP-зависимый AT2-AT1 переход альвеолоцитов при воздействии TRULI. Показано, что в легочных органоидах, культивируемых в присутствии TRULI, доля клеток, экспрессирующих маркеры AT2 клеток, статистически значимо сокращается, при этом доля AT1 возрастает. На модели альвеолярных органоидов показано, что в присутствии TRULI наблюдается тенденция к увеличению количества органоидов и рост количества пролиферирующих клеток. По данным иммуноцитохимического анализа доля AT2 клеток значительно снижается, в то время как общее количество клеток увеличивается. После воздействия VTP на органоиды количество колоний органоидов значительно снижается, а также уменьшается клеточная пролиферация, при этом доля AT2 клеток незначительно увеличивается по сравнению с контролем.

Таким образом, показано, что воздействие TRULI приводит к YAP-зависимой дифференцировке прогениторных клеток альвеолярного эпителия, а также к подавлению IL-6/JAK/STAT сигналинга в мезенхиме легких мыши.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-30015) <https://www.rscf.ru/project/21-74-30015/>.

Список литературы

1. van Soldt B.J., Cardoso W.V. Hippo-Yap/Taz signaling: Complex network interactions and impact in epithelial cell behavior // Wiley Interdiscip Rev Dev Biol. 2020. Vol. 9, N 3. ID e371. doi: 10.1002/wdev.371
2. Xue C., Yao Q., Gu X., et al. Evolving cognition of the JAK-STAT signaling pathway: autoimmune disorders and cancer // Sig Transduct Target Ther. 2023. Vol. 8. ID 204. doi: 10.1038/s41392-023-01468-7
3. Kizawa R., Araya J., Fujita Y. Divergent roles of the Hippo pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis: tissue homeostasis and fibrosis // Inflamm Regen. 2023. Vol. 43, N 1. ID 45. doi: 10.1186/s41232-023-00295-1
4. Montero P., Milara J., Roger I., Cortijo J. Role of JAK/STAT in interstitial lung diseases; molecular and cellular mechanisms // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22, N 12. ID 6211. doi: 10.3390/ijms22126211
5. Govorova I.A., Nikitochkina S.Y., Vorotelyak E.A. Influence of intersignaling crosstalk on the intracellular localization of YAP/TAZ in lung cells // Cell Commun Signal. 2024. Vol. 22. ID 289. doi: 10.1186/s12964-024-01662-2

Головнева Е.С.✉, Тахавиев Р.В., Брюхин Г.В.

Модуляция регенеративного ответа мышечной ткани лазерным воздействием зеленого и инфракрасного спектра

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», Челябинск, Россия

✉ micron30@mail.ru

Аннотация. В эксперименте установлено, что лазерное воздействие в зеленом и инфракрасном спектре на поврежденную мышечную ткань приводит к активации и увеличению количества миосателлитных клеток, модуляции реакций тучных клеток и росту площади сосудистого русла в зависимости от длины волны излучения.

Ключевые слова: фотомодуляция; лазер; регенерация; мышцы; миосателлиты.

Golovneva E.S., Tahaviev R.V., Bryukhin G.V.

Modulation of the regenerative response of muscle tissue by laser action of the green and red spectrum

South Ural State Medical University, Cheliabinsk, Russia

Abstract. The experiment found that laser exposure in the green and infrared spectrum to damaged muscle tissue leads to the activation and increase in the number of myosatellite cells, modulation of mast cell reactions and an increase in the area of the vascular bed depending on the wavelength of radiation.

Keywords: photomodulation; laser; regeneration; muscle; myosatellite cells.

Неуклонный рост бытового и военного травматизма актуализирует проблему реабилитации после повреждений скелетной мышечной ткани. В мышечной ткани главным источником регенерации выступают миосателлиты или клетки камбиального резерва. При дефиците их пролиферативного потенциала формируется выраженный соединительнотканый рубец, существенно ухудшающий функцию мышцы. Установлено, что инфракрасная фотобиомодуляция является универсальным способом усиления пролиферации клеток различных тканей [1, 2], однако возможности регуляции регенеративного ответа клеточных популяций мышечной ткани при лазерном воздействии мало изучены. Целью исследования являлся анализ влияния инфракрасного и зеленого лазерного воздействия на регенеративный потенциал поврежденной скелетной мышцы.

Эксперимент проводился на 156 крысах Вистар. Моделирование повреждения — формирование скальпельной резанной раны *m. gastrocnemius*. Группы фотобиомодуляции: 970 нм и 520 нм, при мощности 1,0 Вт, экспозиция 60 с и 180 с. Животных выводили из эксперимента на 1, 3, 7, 14, 30-е сутки. Материал мышц фиксировали, изготавливали гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим и иммуногистохимически с использованием антител к MyoD. Морфометрический анализ проводился при помощи программы ImageScore M (Германия). Подсчитывали количество миоядер, толщину мышечных волокон, количество и показатель дегрануляции тучных клеток, количество капилляров, количество и площадь MyoD+ ядер. Достоверность различий оценивали 4-х факторным методом дисперсионного анализа ANOVA. Статистически значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

После нанесения резаной раны количество миоядер в мышце снижалось в первые сутки, а в группах лазерного воздействия не только не снижалось, но и увеличивалось. Толщина мышечных волокон с 1-х по 7-е сутки после нанесения раны была снижена относительно контроля, в группах инфракрасного лазерного воздействия повышалась на 3-и сутки.

MyoD играет ключевую роль в регуляции дифференцировки активированных миосателлитоцитов. Экспрессия MyoD была выявлена как в мелких гиперхромных ядрах по периферии мышечного волокна, так и в гипохромных ядрах, которые при окраске гематоксилин-эозин относят к ядрам зрелых мышечных волокон. Количество MyoD+ ядер в лазерных группах было достоверно выше на 3-и и 7-е сутки, при экспозиции 60 с. Площадь MyoD+ ядер при инфракрасном воздействии была больше по сравнению с динамическим контролем с 3-х суток эксперимента, а при облучении зеленым светом — с 7-х суток.

Тучные клетки являются универсальным регулятором регенерации поврежденной ткани, выступая источником факторов роста и медиаторов, необходимых для неоангиогенеза и пролиферации [2]. В нашем эксперименте количество тучных клеток на 1-е сутки было достоверно выше в группах зеленого воздействия, а на 7-е сутки — как при зеленом, так и при инфракрасном воздействии. Содержание дегранулированных клеток повышалось в группах лазерного воздействия с 1-х суток по 7-е сутки эксперимента.

Количество капилляров в мышечной ткани во всех экспериментальных группах снижалось на 1-е сутки, более выражено при зеленом лазерном воздействии. Однако с 3-х суток показатель начинал расти, причем эффективнее было влияние инфракрасного лазера с экспозицией 180 с.

Механизмы, благодаря которым может реализоваться прямое активирующее воздействие лазерного излучения на миосателлитоциты, связаны с известным феноменом изменения проницаемости мембран клетки для ионов кальция, в частности наблюдаемом при стимуляции лазером TRPV1 и TRPV4 каналов. Увеличение концентрации кальция, через кальмодулин, может вызывать модификацию гистоновых белков и гетерохроматина, что приводит к повышению экспрессии гена, детерминирующего миогенез, и белка MyoD [3].

Таким образом, воздействие лазерной фотобиомодуляции зеленого и инфракрасного диапазона на поврежденную скелетную мышечную ткань способствует сохранению пула миоядер, ранней пролиферации камбиальных элементов и приводит к увеличению количества и площади ядер активированных (MyoD+) миосателлитоцитов. В процессе заживления раны мышцы при воздействии лазера происходит рост количества капилляров, более выраженный при инфракрасном лазерном воздействии длительностью 180 с, на фоне увеличения численности и активации тучных клеток.

Список литературы

1. Галлямутдинов Р.В., Астахова Л.В., Головнева Е.С., Серышева О.Ю. Влияние лазерного инфракрасного излучения на некоторые морфофункциональные показатели регенерирующей скелетной мышцы в возрастном аспекте // Лазерная медицина. 2020. Т. 24, № 2-3. С. 90–94. EDN: IAWTKA doi: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-90-94
2. Головнева Е.С. Динамика уровня основного фактора роста фибробластов в процессе неоангиогенеза, стимулированного воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 134, № 7. С. 109–111. EDN: SEVMSL
3. Wardle F.C. Master control: transcriptional regulation of mammalian MyoD // J Muscle Res Cell Motil. 2019. Vol. 40, N 2. P. 211–226. doi: 10.1007/s10974-019-09538-6

Голубинская П.А.✉, Пикина А.С., Ручко А.С., Еремеев А.В.

Изучение специфической фармакологической активности препарата тканевой инженерии для лечения повреждений хрящевой ткани на кроликах

ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

✉ polinapigeon@gmail.com

Аннотация. Получение 3D-хрящеподобных клеточных конструкторов является перспективным направлением терапии дефектов хряща. Цель данного раздела доклинических исследований — оценка специфической фармакологической активности продукта на основе хондроцитов на модели повреждения суставного хряща у кроликов.

Ключевые слова: хондроциты; доклинические исследования; препарат тканевой инженерии; артроз; травма.

Golubinskaya P.A., Pikina A.S., Ruchko E.S., Eremeev A.V.

Study of specific pharmacological activity of tissue engineered product for treatment of cartilage tissue damage in rabbits

Lopukhin FRCC PCM, Moscow, Russia

Abstract. The production of 3D cartilage-like cell constructs is a promising direction for the therapy of cartilage defects. The purpose of this section of preclinical studies is to evaluate the specific pharmacological activity of the product based on chondrocytes in models of articular cartilage damage in rabbits.

Keywords: chondrocytes; preclinical studies; tissue engineering drug; arthrosis; trauma.

Особенности строения гиалиновой хрящевой ткани ограничивают её способность к регенерации. В этой связи травмы суставного хряща приводят к развитию артрозов и дальнейшей инвалидизации пациентов, что делает необходимой разработку новых подходов в терапии. Классические хирургические методы лечения патологий суставного хряща имеют свои особенности, связанные с многочисленными побочными эффектами и осложнениями [1]. Таким образом, лечение повреждений хряща долгое время было значительной проблемой в клинической практике. Многообещающий подход для решения данной проблемы — применение тканевой инженерии. Использование 3D-хрящеподобных конструкторов на основе хондроцитов — хондросфер — перспективно для коррекции объемных дефектов суставного хряща. Подобная клеточная терапия внедрена в клинику за рубежом, при этом лечение проводят с использованием аутологичных клеток. Используемая нами технология реакторного культивирования значительно упрощает процесс получения хрящевых имплантатов по сравнению с зарубежным аналогом, позволяет сохранить их дифференцированное состояние и способность синтезировать межклеточный матрикс, что приближает характеристики имплантата к нативному хрящу. Таким образом, преимуществом данного продукта является возможность его локального введения в место повреждения, что обеспечивает таргетную доставку, способствует выработке компонентов внеклеточного матрикса в зоне введения, а также минимизирует местную иммунную реакцию организма и снижает риск эктопического роста ткани.

На данном этапе исследований оценивали специфическую фармакологическую активность продукта тканевой инженерии (ПТИ) на основе аллогенных хондроцитов на модели поврежденного суставного хряща у кроликов породы Советская шиншилла. Исследование выполнялось на группе из 4 кроликов при внутрисуставном способе введения ВТЛП: левая задняя лапа использовалась в качестве плацебо-контроля; в правую заднюю лапу вводили ПТИ.

Культура хондроцитов была выделена из биопсийных фрагментов хряща с помощью коллагеназной обработки. Помимо биопсии у животного брали венозную кровь для получения сыворотки, необходимой для ведения чистой культуры хондроцитов и получения Хондросфер. Клеточная культура была охарактеризована с помощью ПЦР на хондрогенные маркеры агрекан, SOX9, коллаген 1-го и 2-го типа [2]. Клетки в 2D-культуре растили во флаконах для получения необходимого количества. Для получения сфероидов использовали планшет с микролунками. Сфероиды культивировали в биореакторах в динамических условиях на шейкере, после чего их имплантировали модельным животным, все манипуляции с которыми проводили после карантинизации и согласно требованиям действующих нормативных регуляторов [3, 4]. Исследуемый препарат вносили в сформированные в коленном суставе дефекты глубиной и диаметром 2–3 мм (имплантационных ложе). В контрольных контрлатеральных суставах сформированные дефекты суставного хряща оставляли незаполненными — в полость дефектов вносили физиологический раствор. Особенность расчета доз ПТИ связана с физическими размерами продукта и размерами дефекта хрящевой ткани: для закрытия дефектов у одного животного применялось до 10 сфероидов. После внесения ПТИ проводили послойное ушивание области раны. Ориентируясь на данные литературы, согласно которым минимальный срок интеграции хрящевой ткани — 3 месяца [5], выведение животных из эксперимента производили через 1 и 3 месяца после проведения имплантации хондросфер.

Через 30 суток после моделирования повреждения хрящевой ткани в контроле обнаружены признаки артрита. В опытной группе в синовиальной оболочке суставов были выявлены единичные полнокровные капилляры без признаков воспаления и успешная интеграция хондросфер в хрящевую ткань. Кроме того, у животных в опытной группе с применением ПТИ макроскопически наблюдалось физическое закрытие дефекта ткани по сравнению с контролем.

Через 90 суток после моделирования повреждения в контроле обнаружены признаки артрита: периваскулярный воспалительный инфильтрат, пролиферативный синовит с гиперплазией и гипертрофией синовиальных клеток, признаки фиброза. В ряде образцов обнаруживаются увеличенные хондроцитарные лакуны с мертвыми хондроцитами. Признаки регенеративных процессов были минимальны. В группах введения в зону повреждения хрящевой ткани ПТИ хондросферы наблюдаются процессы регенерации хряща: плотный значительно менее выраженный периваскулярный воспалительный инфильтрат, активная пролиферация. Следует отметить, что хрящевой матрикс и связанные с ним хондроциты в большинстве своём были организованы в хорошо упорядоченные зоны, характерные для неповреждённого хряща.

Таким образом, подтверждена специфическая фармакологическая активность исследуемого препарата тканевой инженерии на кроликах. На основании данных, полученных в ходе исследований, рекомендованной дозой для проведения I фазы клинических исследований предложено считать дозу 10–70 шт./см² дефекта хрящевой ткани.

Данная работа выполнена в рамках государственного задания «Хондросфера-2», номер государственного учета НИОКТР АААА-А19-119052890054-4.

Список литературы

1. Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С., и др. Применение гидрогелевых скаффолдов в качестве носителя клеток для восстановления хрящевой ткани // *Гены и Клетки*. 2024. Т. 19, № 1. С. 43–59. EDN: GUYXBG doi: 10.17816/gc606639
2. Еремеев А.В., Зубкова О.А., Ручко Е.С., и др. Ключевые характеристики аутологичного биомедицинского продукта для коррекции дефекта хрящевой ткани // *Медицина экстремальных ситуаций*. 2020. Т. 22, № 4. С. 59–66. EDN: OQVWAH doi: 10.47183/mes.2020.014
3. www.consultant.ru [Электронный ресурс]. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 30 октября 2018 г. 512Н «Об утверждении правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». С. 1–71. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_310301/
4. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Москва: Гриф и К, 2012. 944 с.
5. Arumugam S., Bhupesh Karthik B., Rajeswar C., et al. Transplantation of autologous chondrocytes ex-vivo expanded using Thermoreversible Gelation Polymer in a rabbit model of articular cartilage defect // *J Orthop*. 2017. Vol. 14, N 2. P. 223–225. doi: 10.1016/j.jor.2017.01.003

Голубцова Н.Н. ✉, Прокопьева Т.Н., Гунин А.Г.

Участие mTOR-сигнализации в регуляции регенерации дермы человека с возрастом

Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова, Чебоксары, Россия

✉ golubnata@list.ru

Аннотация. Цель работы — выявление белка mTOR в фибробластах дермы человека в различные возрастные периоды иммуногистохимическим методом. Экспрессия mTOR в фибробластах дермального слоя кожи человека максимальна в период антенатального развития и снижается от рождения до 60 лет.

Ключевые слова: кожа; старение; фибробласты; mTOR; PCNA; виментин.

Golubtsova N.N., Prokopenva T.N., Gunin A.G.

mTOR signaling in skin regeneration regulation while aging

The Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russia

Abstract. This research aimed to identify the mTOR protein in human dermal fibroblasts at different ages. mTOR detection made by indirect immunohistochemical method. mTOR protein expression in fibroblasts of the dermal layer of human skin found its maximum value on the antenatal period and it decreases from birth to 60 years old.

Keywords: skin; aging; fibroblasts; mTOR; PCNA; vimentin.

Понимание фундаментальных механизмов регенерации кожи, как самого крупного органа человеческого тела, является актуальной проблемой. Система mTOR (мишень рапамицина у млекопитающих) широко обсуждается в мировой литературе в связи с вовлеченностью в регуляцию различных патологических процессов, включая онкологические заболевания, метаболические расстройства и нейродегенерацию [1]. Сигнальный путь mTOR играет ключевую роль в контроле клеточного роста, пролиферации и метаболизма, а также важен для регенерации тканей. Однако на сегодняшний день значение mTOR для физиологической регенерации кожи человека остается недостаточно изученным. Исследование роли mTOR в процессах, связанных с заживлением кожи, может открыть новые перспективы для понимания механизмов восстановления [1]. Разработка новых препаратов для тканеспецифической активации или ингибирования mTOR может быть полезна для пациентов, нуждающихся в специфической регенерации тканей.

Целью данной работы является исследование локализации и экспрессии mTOR в фибробластах дермального слоя кожи человека в антенатальный и постнатальный периоды онтогенеза человека. Аутопсийный материал кожи человека без разделения по гендерному признаку получали у плодов от 20 недель беременности и людей от рождения до 85 лет. Гистологические срезы кожи окрашивали гематоксилином и эозином для описания общеморфологических изменений кожи с возрастом. Иммуногистохимический метод окрашивания на виментин применяли для верификации фибробластов, ядерный антиген пролиферирующих клеток (PCNA) как маркер пролиферативной активности фибробластов и мишень рапамицина для млекопитающих (mTOR).

Проведенные нами исследования выявили, что основные хронологические изменения морфологии кожи человека обусловлены уменьшением общей численности тканеобразующих клеток дермы — фибробластов [2]. Корреляционный анализ подтвердил наличие достоверной взаимосвязи между возрастными изменениями общего числа фибробластов с такими параметрами старения дермы, как увеличение численности тучных клеток, ухудшение микроциркуляции соединительнотканного слоя кожи, изменение экспрессии фактора роста соединительной ткани и др. [3, 4].

Указанные явления приводят к необратимым изменениям внешнего вида кожи с возрастом и оказывают влияние на регенеративный потенциал дермы человека. Было установлено, что уменьшение численности фибробластов коррелирует со снижением их пролиферативной активности, начиная от плодного периода и до пожилого возраста. Это приводит к уменьшению функциональности фибробластов дермы, деструкции коллагенового матрикса и уменьшению эластичности кожи [5].

Мы предположили, что в процесс возрастных изменений дермы могут быть вовлечены белки сигнального пути mTOR. Иммуногистохимическое определение фибробластов дермы с положительным окрашиванием на mTOR выявило, что более 90% фибробластов дермы плодов человека содержат данный белок. Это свидетельствует о вовлеченности в указанный период онтогенеза белков mTOR в регуляцию пролиферации фибробластов в дерме человека, что подтверждено методами медицинской статистики. Сразу после рождения и до 60-летнего возраста доля mTOR-положительных фибробластов в дерме снижается по сравнению с плодным периодом ($p < 0,05$), а затем снова увеличивается. Вероятно, данные изменения обусловлены нейрогуморальными изменениями в организме человека в период периклимактерического и андропausalного возраста, которые предположительно оказывают влияние на mTORсигнализацию и пролиферацию фибробластов дермы человека.

Полученные данные раскрывают решающую роль mTOR в регуляции физиологической регенерации в возрастном аспекте и отражают сложность сигнального пути mTOR.

Список литературы

1. Huang S. mTOR Signaling in metabolism and cancer // *Cells*. 2020. Vol. 9, N 10. ID 2278. doi: 10.3390/cells9102278.
2. Голубцова Н.Н., Васильева О.В., Петров В.В., Гунин А.Г. Изменение содержания регуляторов ангиогенеза DLL4 и JAG-1 в дерме человека в онтогенезе // *Морфология*. 2016. Т. 149, № 1. С. 48–52. EDN: VORKTX
3. Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Николаев Е.Е., Гунин А.Г. Значение SR-протеинкиназы 1 (SRPK1) для регенерации дермы при физиологическом старении // *Гены и Клетки*. 2017. Т. 12, № 3. С. 72. EDN: YZLAHZ
4. Васильева О.В., Голубцова Н.Н., Филиппов Ф.Н., Гунин А.Г. Фактор роста соединительной ткани (CTGF) в дерме человека в онтогенезе // *Онтогенез*. 2016. Т. 47, № 2. С. 75–82. EDN: VRZSDF doi: 10.7868/S0475145016020099
5. He X., Wan F., Su W., Xie W. Research progress on skin aging and active ingredients // *Molecules*. 2023. Vol. 28, N 14. ID 5556. doi: 10.3390/molecules28145556

Голубчиков Д.О.✉, Евдокимов П.В., Путляев В.И.

Биорезорбируемые остеокондуктивные композиты, наполненные аморфным фосфатом кальция для восстановления костной ткани

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

✉ golubchikovdo@my.msu.ru

Аннотация. Аморфный фосфат кальция (АФК) представляет большой интерес для создания композитных материалов для регенеративной медицины. В данной работе были получены биорезорбируемые композиты состава поликапролактон (ПКЛ)-АФК с модулем Юнга $4,2\pm 0,5$ ГПа, что на 50 % больше, в сравнении с не-наполненным ПКЛ.

Ключевые слова: инженерия костной ткани; костные имплантаты; композиты; аморфный фосфат кальция; поликапролактон; 3D-печать; биорезорбируемые скаффолды; остеокондуктивность; модификация поверхности.

Golubchikov D.O., Evdokimov P.V., Putlyaev V.I.

Bioresorbable osteoconductive composites filled with amorphous calcium phosphate for bone tissue regeneration

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Amorphous calcium phosphate (ACP) was revealed as a promising material to fabricate biocomposites for medical applications. In this work, bioresorbable composites composed of polycaprolactone (PCL)-ACP with a Young's modulus of 4.2 ± 0.5 GPa were obtained, which was 50 % higher than for unfilled PCL.

Keywords: bone tissue engineering; bone implants; composite; amorphous calcium phosphate; polycaprolactone; 3D printing; bioresorbable scaffold; osteoconductivity; surface modification.

Существующие тенденции к постепенному повышению среднего возраста населения приводят к значительному росту количества повреждений костной ткани, требующих хирургического вмешательства. За период с 1990 по 2019 год количество различных зарегистрированных травм возросло на 17–93 % [1]. Это приводит к повышению интереса к созданию материалов для имплантатов, которые были бы совместимы с окружающей тканью как механически, так и биологически. Кроме того, материалы нового поколения должны со временем полностью замещаться на нативную ткань.

Поликапролактон получил широкое применения для создания различных медицинских изделий, которые не вызывали негативного отклика со стороны организма человека. Тем не менее поликапролактон имеет гидрофобную поверхность и сравнительно невысокую скорость растворения в среде организма [2]. Введение хорошо растворимого фосфатного компонента (аморфный фосфат кальция, АФК) может привести к повышению остеоиндуктивности и улучшению механических свойств. В настоящий момент известны несколько подходов к формированию трехмерной пористой архитектуры композитов на основе термопластичных полимеров. Наибольшее распространение получила термоэкструзионная 3D-печать, которая имеет ряд недостатков, включая получение слишком шероховатой поверхности и низкое латеральное разрешение. Использование стереолитографии вместо традиционно используемой термоэкструзионной 3D-печати позволяет значительно повысить точность печати.

Аморфный фосфат кальция может быть получен в слабокислых растворах с pH 6–7, а также в сильнощелочных с pH более 11, с целью предотвращения кристаллизации в гидроксипатит. Другим подходом к стабилизации АФК является введение различных катионных и анионных ингибиторов кристаллизации [3].

Целью работы стало создание биорезорбируемых остеокондуктивных композитных скаффолдов на основе поликапролактона, наполненного стабилизированным аморфным фосфатом кальция.

Аморфный фосфат кальция был синтезирован при pH 11,5 в присутствии ряда анионных ингибиторов кристаллизации: цитрат натрия, сукцинат натрия, тартрат натрия, лактат натрия, пирофосфат натрия, триметафосфат натрия и триполифосфат натрия [4]. Была выдвинута гипотеза о механизме стабилизации аморфного фосфата кальция в присутствии данных анионов. Предположительно, в основе ингибирования кристаллизации лежит образование устойчивых комплексов кальция с ионами-ингибиторами на поверхности частиц, сопровождающееся замедлением процессов растворения аморфного фосфата кальция и осаждением гидроксиапатита. Методом рентгенофазового анализа было показано, что все полученные порошки были рентгеноаморфны. Более того, было показано, что полученные порошки имели мезопористую структуру с большой площадью поверхности до 70 м²/г, измеренной методом БЭТ.

Для формирования макропористых композитных скаффолдов был разработан метод литья композитного расплава/раствора в инвертированные керамические формы, созданные с использованием стереолитографической 3D-печати [5]. После литья расплава/раствора под давлением керамические формы были удалены путем растворения в слабокислом растворе при pH 2–4. Было показано, что введение 10 масс.% частиц аморфного фосфата кальция в полимерную матрицу из поликапролактона приводит к увеличению модуля Юнга на 50% больше, в сравнении с ненаполненным ПКЛ: с 2,8±0,4 ГПа до 4,2±0,5 ГПа. Также было определено, гидрофильность поверхности поликапролактона и композитов на его основе может быть повышена путем обработки в растворах лимонной кислоты и гидроксида натрия.

Таким образом, в ходе работы были получены макропористые композитные скаффолды состава поликапролактон-аморфный фосфат кальция. Введение аморфного фосфата кальция приводило к улучшению механических свойств материала, а также к повышению гидрофильности поверхности.

Список литературы

1. Wu A.I., Bisignano C., James S.L., et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019 // *Lancet Psychiatry*. 2021. Vol. 2, N 9. P. e580–e592. doi: 10.1016/S2666-7568(21)00172-0
2. Lam C.X.F., Hutmacher D.W., Schantz J.T., et al. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months *in vitro* and *in vivo* // *J Biomed Mater Res A*. 2009. Vol. 90A, N 3. P. 906–919. doi: 10.1002/jbm.a.32052
3. Gelli R., Ridi F., Baglioni P. The importance of being amorphous: calcium and magnesium phosphates in the human body // *Adv Colloid Interface Sci*. 2019. Vol. 269. P. 219–235. doi: 10.1016/j.cis.2019.04.011
4. Zuev D.M., Golubchikov D.O., Evdokimov P.V., et al. Synthesis of amorphous calcium phosphate powders for production of bioceramics and composites by 3D printing // *Russ J Inorg Chem*. 2022. Vol. 67. P. 940–951. doi: 10.1134/S0036023622070257
5. Golubchikov D., Evdokimov P., Zuev D., et al. Three-dimensional-printed molds from water-soluble sulfate ceramics for biocomposite formation through low-pressure injection molding // *Materials*. 2023. Vol. 16, N 8. ID 3077. doi: 10.3390/ma16083077

Гольдберг М.А.¹ ✉, Смирнов С.В.¹, Оболкина Т.О.¹, Сафонов С.О.¹, Мосолов А.Н.¹, Котельников Н.Л.¹, Волков А.В.², Ахмедова С.А.², Кирсанова В.А.², Свиридова И.К.², Сергеева Н.С.², Комлев В.С.¹

Изготовление персонализированных имплантатов из оксидной керамики с помощью аддитивного производства методом цифровой светодиодной проекции

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

✉ naiv.syper@gmail.com

Аннотация. Методом цифровой светодиодной проекции получены керамические изделия сложной геометрии из ZrO_2 , а также композитов на основе $ZrO_2-Al_2O_3$ для применения в медицине. Представлены результаты физико-химических и механических испытаний, исследований цитосовместимости *in vitro* и остеоинтеграции *in vivo*.

Ключевые слова: цифровая светодиодная проекция; оксидная керамика; диоксид циркония; оксид алюминия; остеоинтегративные свойства; конструкционная керамика.

Goldberg M.A.¹, Smirnov S.V.¹, Obolkina T.O.¹, Safonov S.O.¹, Mosolov A.N.¹, Kotelnikov N.L.¹, A.V. Volkov², Akhmedova S.A.², Kirsanova B.A.², Sviridova I.K.², Sergeeva N.S.², Komlev V.S.¹

Fabrication of personalised oxide ceramic implants using additive manufacturing by digital light processing

¹ Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — branch of National Medical Research Radiological Centre affiliated with Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Ceramic products of complex geometries made of ZrO_2 and $ZrO_2-Al_2O_3$ -based composite materials for medical applications have been obtained by the method of digital light processing. The results of physicochemical and mechanical tests as well as *in vitro* cytocompatibility and *in vivo* osteointegration studies are presented.

Keywords: digital light processing; oxide ceramics; zirconium dioxide; aluminium oxide; osseointegrative properties; structural ceramics.

Керамические материалы на основе диоксида циркония (ZrO_2) и оксида алюминия (Al_2O_3) нашли широкое применение в хирургии, травматологии, стоматологии и онкологии. Создание новых составов биоинертной керамики наравне с новыми способами ее производства способствует ускоренному переходу к персонализированной медицине. Благодаря внедрению 3D-печати керамики достигается контроль над геометрией и микроструктурой изделий при сокращении трудозатрат и упрощении производства во многих сферах. 3D-печать на основе цифровой светодиодной проекции (ЦСП) позволяет изготавливать передовые керамические материалы с возможностью массового производства. Метод цифровой светодиодной проекции, базирующийся на фотополимеризации в ванне, обеспечивает наиболее высокое разрешение в 3D-печати. Для применения данного метода важным является создание составов фотополимерной суспензии на основе керамических порошков, способной обеспечивать формирование отверждаемого слоя заданной толщины под воздействием ультрафиолетового излучения. Были получены керамические изделия на основе композиционных материалов в системе $ZrO_2-Al_2O_3$, допированные оксидами переходных металлов, что обеспечивало

окрашивание фотополимерной суспензии и спеченных изделий. Было показано, что введение оксидов марганца и кобальта обеспечивает улучшение передачи геометрических характеристик компьютерной модели за счет повышения адсорбции света порошком и соответствующего снижения толщины формирующегося слоя. Полученные изделия продемонстрировали отсутствие острой цитотоксичности и цитосовместимость в отношении клеточной линии остеосаркомы человека MG-63. Были получены абатменты и штифты для стоматологии, а также модель костной ткани. Были разработаны составы фотополимерных суспензий на основе ZrO_2 , содержащие добавку силиката натрия. Наличие данной добавки обеспечило повышение активности материалов к спеканию и способствовало сохранению заданных геометрических характеристик, препятствовало образованию трещин в процессе выжигания фотополимера и обеспечивало достижение высоких механических характеристик. Методом ЦСП были получены керамические изделия, остеоинтеграция которых была исследована на модели большеберцовой кости крысы. При морфометрическом анализе контакт кости с поверхностью имплантата составил 97,3%. При этом 2,7% площади незанятой костной ткани контактировали с ретикулярной стромой костного мозга. Таким образом, результаты свидетельствовали о хорошей остеоинтеграции. Ожидается, что в ближайшие годы технология цифровой светодиодной проекции начнет активно конкурировать и заменять традиционные методы формования керамических изделий.

Работа выполнена при поддержке государственного задания 075-00320-24-01.

Гольцева Ю.Д.¹, Ярушкина И.С.² ✉, Цоколаева З.И.^{1,3}, Белоглазова И.Б.¹, Ратнер Е.И.¹, Азимова Е.Л.², Гуреевков А.Д.^{1,2}, Парфенова Е.В.^{1,2}, Дергилев К.В.¹

Сравнение свойств сфероидов (кардиосфер), полученных двумя разными способами

¹ ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

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

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитации», Москва, Россия

✉ irinayarushk@gmail.com

Аннотация. Кардиосферы двух типов проявляли проангиогенные свойства, способствующие формированию сосудистого кардиального микроокружения. U-кардиосферы, в сравнении с PDL-кардиосферами, обладают рядом преимуществ, что делает их перспективным кандидатом для тестирования препаратов и регенеративных технологий.

Ключевые слова: кардиосферы; ангиогенез; микроокружение; тканевая инженерия.

Goltseva Yu.D.¹, Iarushkina I.S.¹, Tsokolaeva Z.I.^{1,3}, Beloglazova I.B.¹, Ratner E.I.¹, Azimova E.L.¹, Gureenkov A.D.^{1,2}, Parfenova E.V.^{1,2}, Dergilev K.V.¹

The comparison of properties of spheroids (cardiospheres) obtained by two different methods

¹ National Medical Research Center for Cardiology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Negovsky Scientific Research Institute of General Reanimatology of the Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia

Abstract. Cardiospheres of two types exhibited proangiogenic properties that contributed to the formation of cardiac vascular microenvironment. In comparison with PDL-cardiospheres, U-cardiospheres have a number of advantages, that makes them a promising candidate for testing of drugs and regenerative technologies.

Keywords: cardiospheres; angiogenesis; microenvironment; tissue engineering.

На протяжении длительного периода времени фармакологическая индустрия использовала для тестирования прототипов лекарственных препаратов 2D-клеточные культуры, которые имеют существенные недостатки в плане воспроизведения микроокружения тканей *in vivo* и низкую «предсказательную» силу. В связи с этим только единичные препараты проходили сложный путь от научной концепции до клинических испытаний и внедрения в клиническую практику. Развитие тканевой инженерии позволило переосмыслить этот подход и перейти к проектированию и созданию клеточных 3D-моделей. Данные модели нашли свое применение для воспроизведения микроокружения тканей *ex vivo*, для изучения патогенеза заболеваний и тестирования подходов/препаратов терапевтического воздействия. Они получили название сфероиды. Сфероиды — это трехмерные самоорганизующиеся клеточные агрегаты, которые с определенной долей допущения воспроизводят микроокружение и межклеточные взаимодействия нативных тканей. Особое внимание заслуживают васкуляризованные сфероиды на основе клеток сердца (кардиосферы), которые могут воспроизводить сосудистое микроокружение, использоваться для моделирования *ex vivo* микрососудистой дисфункции и поиска молекулярных мишеней для ее коррекции. Несмотря на перспективность использования васкуляризованных сфероидов, механизмы их сборки, проангиогенные свойства и характеристики в зависимости от способа получения остаются малоизученными.

Цель исследования: Выполнить сравнительную оценку свойств кардиосфер, полученных двумя разными способами.

PDL-кардиосферы получали из клеток, выделенных методом эксплантной культуры из сердец мышей C57Bl6, путем посадки на поли-D-лизин и культивирования в течение 72 ч в среде 35 % IMDM, 65 % DMEM/F-12, содержащей 3 % сыворотки, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 8 нг/мл кардиотрофина-1, 1 ЕД тромбина и 1x NeuroBrew-21.

Для формирования U-кардиосфер использовали клетки эксплантной культуры сердец мышей C57Bl6, культивированные в U-образных низкоадгезионных чашках в течение 72 часов. Мы сравнили полученные сфероиды по их форме и размерам, экспрессии генетических маркеров, фенотипу, проангиогенным свойствам и проанализировали полученный секретом. Морфометрия сфероидов проводилась с использованием программного обеспечения NISai (Nikon). Для исследования свойств использована проточная цитофлуориметрия, иммуноцитохимия, LIVE/DEAD assay, ELISA и тест васкуляризации матригеля после подкожной трансплантации.

Мы обнаружили, что кардиосферы, сформированные на poly-D-лизине, характеризуются вариабельностью размеров (100–200 мкм) в сравнении с U-кардиосферами. Клетки в их составе имеют сходные показатели жизнеспособности. В состав сфероидов двух типов входили белки внеклеточного матрикса (коллаген 1, коллаген 3, фибронектин, ламинин), а также клетки, характерные для сосудистого микроокружения (эндотелий, гладкомышечные клетки/перicytes, клетки с мезенхимальными маркерами (CD73+, CD90+ и CD105+), фибробласты, а также сосудистые прогениторные клетки (OCT4+, Sca-1+ и c-Kit+). В отличие от PDL-кардиосфер, сформированных на poly-D-лизине, U-кардиосферы содержали большее количество фибронектина, сосудистых Sca-1+прогениторных клеток и сформированных CD31+ сосудистых структур. Сфероиды двух типов секретировали сопоставимое количество VEGF и обладали способностью стимулировать васкуляризацию матригеля после их подкожной трансплантации *in vivo*.

Таким образом, полученные методами U-well и выращенные на poly-D-лизине кардиосферы проявляют проангиогенные свойства, способствующие формированию сосудистого кардиального микроокружения, поддерживающего рост сосудистых структур в их составе. U-кардиосферы, в сравнении с PDL-кардиосферами, обладают рядом преимуществ, связанных с отсутствием вариабельности размеров, повышенным содержанием васкулогенных прогениторных клеток и сформированных сосудистых структур, что позволяет их рассматривать в качестве перспективного кандидата для тестирования фармакологических препаратов и регенеративных технологий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-15-00540.

Список литературы

1. Davis D.R., Zhang Y., Smith R.R., et al. Validation of the cardiosphere method to culture cardiac progenitor cells from myocardial tissue // PLOS ONE. 2009. Vol. 4, N 9. ID e7195. doi: 10.1371/journal.pone.0007195
2. Scalise M., Marino F., Salerno L., et al. Adult multipotent cardiac progenitor-derived spheroids: a reproducible model of *in vitro* cardiomyocyte commitment and specification // Cells. 2023. Vol. 12, N 13. ID 1793. doi: 10.3390/cells12131793
3. Rahimnejad M., Nasrollahi Boroujeni N., Jahangiri S., et al. Prevascularized micro-/nano-sized spheroid/bead aggregates for vascular tissue engineering // Nanomicro Lett. 2021. Vol. 13, N 1. ID 182. doi: 10.1007/s40820-021-00697-1
4. Anthon S.G., Valente K.P. Vascularization strategies in 3D cell culture models: from scaffold-free models to 3D bioprinting // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23, N 23. ID 14582. doi: 10.3390/ijms232314582
5. De Moor L., Merovci I., Baetens S., et al. High-throughput fabrication of vascularized spheroids for bioprinting // Biofabrication. 2018. Vol. 10, N 3. ID 035009. doi: 10.1088/1758-5090/aac7e6
6. Laschke M.W., Menger M.D. Spheroids as vascularization units: From angiogenesis research to tissue engineering applications // Biotechnol Adv. 2017. Vol. 35, N 6. P. 782–791. doi: 10.1016/j.biotechadv.2017.07.002

Гольцева Ю.Д.^{1,2} ✉, Дергилев К.В.¹, Белоглазова И.Б.¹, Болдырева М.А.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}

Роль урокиназного рецептора в регуляции периваскулярной ниши сердца и развитии фиброза

¹ ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия

✉ eleagnusom@gmail.com

Аннотация. На 3D-клеточной модели периваскулярной ниши сердца — кардиосферах — мы показали, что дефицит uPAR связан со снижением жизнеспособности клеток, развитием эндотелиальной дисфункции, ЭндоМП, снижением числа ЭК, а также с признаками профиброзной трансформации.

Ключевые слова: периваскулярная ниша; кардиосферы; сфероиды; фиброз; эндотелиальная дисфункция; урокиназный рецептор; uPAR.

Goltseva Yu.D.^{1,2}, Dergilev K.V.¹, Beloglazova I.B.¹, Boldyreva M.A.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,2}

The role of the urokinase receptor in the regulation of the cardiac perivascular niche and the development of fibrosis

¹ FSBI «National medical research center of cardiology named after academician E.I. Chazov», Institute of Experimental Cardiology named after academician V.N. Smirnov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Faculty of Fundamental Medicine, Moscow, Russia

Abstract. Using a 3D cellular model of the cardiac perivascular niche, cardiospheres, we showed that uPAR deficiency is associated with decreased cell viability, development of endothelial dysfunction, EndoMT, reduced EC number, and features of profibrotic transformation.

Keywords: perivascular niche; cardiospheres; spheroids; fibrosis; endothelial dysfunction; urokinase receptor; uPAR.

Хроническая сердечная недостаточность с сохраненной фракцией выброса (ХСНсФВ) представляет собой серьезную проблему современной кардиологии, не имеющую эффективного лечения. В ее основе лежат микроваскулярные нарушения на фоне латентного системного воспаления, приводящие к развитию периваскулярного и интестичиального фиброза миокарда. За развитие микроваскулярной дисфункции ответственно нарушение тонкого баланса взаимной регуляции клеточных компонентов периваскулярной ниши сердца, в регуляции которой и развитии фиброза существенную роль может играть рецептор урокиназы (uPAR), дефицит которого у трансгенных мышей связан со спонтанным развитием фиброза легких, почек и сердца. Однако механизмы его участия в регуляции периваскулярной ниши сердца и в развитии сердечного фиброза не изучены. Целью данной работы является исследование механизмов участия uPAR в формировании профиброзных изменений периваскулярной ниши сердца.

В качестве 3D-клеточной модели периваскулярной ниши сердца мы использовали кардиосферы (кардиальные сфероиды). Кардиосферы получали из клеток, выделенных методом эксплантной культуры из сердец мышей C57Bl/SV129 дикого типа (Wt) и нокаутированных по uPAR (uPAR^{-/-}), путем посадки на поли-D-лизин и культивировании в течение 72 ч в среде 35% IMDM, 65% DMEM/F-12, содержащей 3 % сыворотки, 20 нг/мл EGF, 20 нг/мл bFGF, 8 нг/мл кардиотрофина-1, 1 ЕД тромбина и 1x NeuroBrew-21. Клетки кардиосфер получали при «разборке» кардиосфер в 2D-условиях на фибронетине. Клетки иммунофенотипировали методом проточной цитофлуориметрии, кардиосферы — методом иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов. Жизнеспособность кардиосфер оценивали по соотношению живых и мертвых клеток с помощью

коммерческого набора LIVE/DEAD™ Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen). Уровень содержания белков оценивали методом иммуноблоттинга, уровень содержания секретируемых факторов в кондиционных средах — набором ProteomeProfiler antibody arrays (R&D). Эндотелиальные клетки (ЭК) выделяли из легких Wt мышей методом иммуномагнитной селекции по CD31. Анализ жизнеспособности ЭК оценивали с помощью реагента PrestoBlue Cell Viability Reagent (Invitrogen), анализ формирования капилляроподобных структур оценивали на Матригеле (Corning).

Формируемые Wt кардиосферы содержали основные компоненты периваскулярной ниши сердца: CD31+ ЭК, SMA+ фибробласты (ФБ) / гладкомышечные клетки (ГМК), CD90+, CD105+ и CD73+ мезенхимоподобные клетки, c-Kit+, Sca1+ васкулогенные прогениторные клетки сердца, а также несли компоненты урокиназной системы — uPAR и урокиназу (uPA). В отличие от Wt кардиосфер, uPAR-/- кардиосферы обладали сниженной жизнеспособностью и содержали в 4 раза меньше CD31+ ЭК. На уровне белка uPAR-/- кардиосферы содержали больше SMA (в 3 раза), SM22 α (в 5 раз), коллагена I (в 9 раз), фибронектина (в 2 раза) и коллагена IV (в 5 раз). Такие изменения периваскулярной ниши соотносятся с уменьшением плотности микрососудов и развитием периваскулярного фиброза в сердце больных ХСНсФВ. Кроме того, uPAR-/- кардиосферы содержали больше фактора фон Виллебранда (vWF, в 8 раз), являющегося маркером эндотелиальной дисфункции, больше неактивной формы uPA (в 4 раза), которая способна транслоцироваться в ядро и стимулировать экспрессию SMA, а также больше активной формы TGF β 1 (в 5 раз) — главного индуктора фиброза и эндотелиально-мезенхимального перехода (ЭндоМП). В uPAR-/- кардиосферах наблюдались признаки активации ЭндоМП в отличие от Wt: повышенное содержание SNAIL (в 3 раза) и колокализация CD31 и SMA. При анализе секретома Wt и uPAR-/- клеток кардиосфер мы обнаружили, что в случае uPAR-/- клетки секретируют больше IGFBP-2, тромбоспондина-2, VEGF, Serpin F1 и PDGF-AA и меньше MCP-1, ангиогенина, пролиферина и PlGF. Однако данные изменения не оказывали влияние на проангиогенные свойства секретома uPAR-/- клеток кардиосфер. Жизнеспособность ЭК и их способность формировать капилляроподобные структуры на Матригеле при обработке кондиционными средами Wt и uPAR-/- клеток кардиосфер не отличались. Известно, что эндотелиальная дисфункция приводит к нарушению способности ЭК к ангиогенезу. uPAR-/- клетки кардиосфер не формировали капилляроподобные структуры на Матригеле в отличие от Wt, т.е. обладали сниженным ангиогенным потенциалом.

Таким образом, при использовании 3D-клеточной модели периваскулярной ниши сердца — кардиосфер — мы показали, что дефицит uPAR связан с развитием эндотелиальной дисфункции, сниженной жизнеспособностью клеток и сниженной ангиогенной способностью, а также активацией ЭндоМП, что может вносить вклад в снижение числа ЭК. При дефиците uPAR увеличивается содержание профиброзных факторов, что ассоциировано с наличием профиброзных изменений — феноконверсией ФБ и/или ГМК (SMA и SM22 α) и избыточным отложением белков ВКМ.

Работа выполнена при финансировании гранта РФФИ № 23-15-00540.

Гончаренко А.В.✉, Жамгочан Х.Х., Шумков М.С.

Рекомбинантные пробиотики как векторы для доставки регуляторных полипептидов в желудочно-кишечный тракт

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, Россия

✉ pylaevanna@gmail.com

Аннотация. Регенерация тканей может быть активирована путем доставки к месту поражения регуляторных молекул, способствующих этому процессу. Разработан рекомбинантный пробиотический штамм *E. coli* для доставки в желудочно-кишечный тракт целевых белковых продуктов.

Ключевые слова: желудочно-кишечный тракт; болезнь Крона; регенерация; *Escherichia coli*; β -субъединица холерного токсина; СТВ.

Goncharenko A.V., Jamgochian H.H., Shumkov M.S.

Recombinant probiotics as vectors for delivery of regulatory polypeptides to the gastrointestinal tract

Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the RAS, Moscow, Russia

Abstract. Tissue regeneration can be activated by delivery to the lesion site of re-regulatory molecules that promote this process. A recombinant probiotic strain of *E. coli* has been developed to deliver targeted protein products to the gastrointestinal tract.

Keywords: gastrointestinal tract; Crohn's disease; regeneration; *Escherichia coli*; cholera toxin β -subunit; CTB.

Восстановление тканей, повреждённых вследствие травмы и заболевания, — часто длительный и несовершенный процесс. Особенно при наличии хронического воспаления, как в случае с болезнью Крона. Доставка к месту поражения регуляторных молекул, способствующих регенерации, может обеспечить более успешный исход. Одним из перспективных подходов осуществления такой доставки в ЖКТ является использование рекомбинантных пробиотических штаммов бактерий в качестве векторов. Такие штаммы обладают антагонистической активностью против патогенных микроорганизмов и стимулируют формирование нормальной микрофлоры, что в свою очередь способствует регенеративным процессам. Однако традиционными прокариотическими продуцентами рекомбинантных белков являются искусственно адаптированные под эти цели лабораторные штаммы. Целью исследования являлась разработка пробиотического штамма *Escherichia coli*, осуществляющего индуцированную экспрессию целевого продукта в условиях *in vitro* и в кишечнике животного. Объектом исследования являлся пробиотический штамм *E. coli* M17, с доказанными свойствами подавления патогенной микрофлоры, модельным объектом экспрессии в *E. coli* M17 выбрана β -субъединица холерного токсина (СТВ), кодируемая геном *ctxB*. Выбор СТВ как объекта экспрессии определен тем, что существуют убедительные доказательства иммунотерапевтического потенциала СТВ, в частности показано, что СТВ эффективно снижает воспаление при болезни Крона [1], снижает уровень провоспалительных цитокинов IL-12 и IL-6 и увеличивает уровень IL-10 [2]. Ген *ctxB* был слит с последовательностью, кодирующей сигнал секреции белка OmpA *E. coli* и клонирован в вектор pET22b. В векторе pET22b промотор T7 был заменен на промотор T5, не требующий вирусной РНК полимеразы. В результате был получен вектор pET22b-T5-OmpA-CTB. Вектор был трансформирован в штамм *E. coli* M17, в результате чего был получен рекомбинантный штамм *E. coli* M17-CTB. Классическим индуктором экспрессии *in vitro* является IPTG, но он непригоден для экспрессии *in vivo*, поэтому для индукции экспрессии

была использована лактоза. Выход белка *in vitro* при индукции лактозой был сопоставим с выходом белка при индукции IPTG и составлял до 50 мг/л культуры. Следующим этапом работы была детекция синтеза СТВ в кишечнике животного. Поскольку продукция СТВ рекомбинантным штаммом в кишечнике должна была сопровождаться формированием иммунного ответа к нему, мы оценивали экспрессию СТВ в организме животного по формированию мукозального иммунного ответа к СТВ у животных, получивших рекомбинантный штамм *E. coli* M17-СТВ. Для этого мышам линии BALB/c с интервалом в 6 недель двукратно с помощью зонда вводили в желудок по 10^8 клеток штамма *E. coli* M17-СТВ в буферном растворе, контролями служили мыши получившие по 10^8 клеток штамма *E. coli* M17 и получившие буферный раствор pH7. Через 2 недели после последнего введения была собрана кровь и смывы со стенок кишечника, в которых иммуноферментным анализом определяли суммарные иммуноглобулины к СТВ. Анализ обнаружил антитела против СТВ, что свидетельствует о продукции СТВ штаммом *E. coli* M17-СТВ в просвет кишечника. Таким образом, исследование показало на примере СТВ возможность осуществления индуцированной экспрессии белковых регуляторных молекул пробиотическим штаммом *E. coli* в условиях *in vitro* и в кишечнике животного. Штамм *E. coli* M17-СТВ может быть интересен для исследований, связанных с терапией воспалительных процессов и трансплантацией кишечника.

Список литературы

1. Boirivant M., Fuss I.J., Ferroni L., et al. Oral administration of recombinant cholera toxin subunit B inhibits IL-12-mediated murine experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis // *J Immunol*. 2001. Vol. 166, N 5. P. 3522–3532. doi: 10.4049/jimmunol.166.5.3522
2. Denes B., Fodor I., Langridge W.H. Persistent suppression of type 1 diabetes by a multicomponent vaccine containing a cholera toxin B subunit-autoantigen fusion protein and complete Freund's adjuvant // *Clin Dev Immunol*. 2013. ID 578786. doi: 10.1155/2013/578786

Горностаева А.Н.¹, Матвеева Д.К.¹, Кочетова Э.С.^{1,2} ✉, Андреева Е.Р.¹, Буравкова Л.Б.¹

Характеристика внеклеточного матрикса и ассоциированных с ним молекул, продуцируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками из разных тканевых источников

¹ ГНЦ РФ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

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

✉ evelina_kochetova@mail.ru

Аннотация. Сравнительная оценка внеклеточного матрикса (ВКМ) от мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из ткани (МСК-ТПК) пупочного канатика и жировой ткани показала увеличение толщины ВКМ от МСК-ТПК, на фоне увеличения экспрессии генов структурных компонентов ВКМ и снижения — металлопротеиназ.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; металлопротеиназы; коллаген; фибронектин; децеллюляризация; голотомография.

Gornostaeva A.N.¹, Matveeva D.K.¹, Kochetova E.S.^{1,2}, Andreeva E.R.¹, Buravkova L.B.¹

Characteristics of the extracellular matrix and associated molecules produced by multipotent mesenchymal stromal cells from different tissue sources

¹ Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. In comparison to adipose tissue MSCs, umbilical cord-derived MSCs demonstrated an upregulation of extracellular matrix (ECM) structural molecules' encoding genes and downregulation of metalloproteinases' genes along with increased ECM thickness.

Keywords: extracellular matrix; multipotent mesenchymal stromal cells; metalloproteinases; collagen; fibronectin; decellularization; holotomography.

Внеклеточный матрикс (ВКМ) — это комплексная макромолекулярная структура, обеспечивающая механическую поддержку и регуляцию гомеостаза тканей, в том числе за счёт депонированных и ассоциированных с ним молекул. Децеллюляризованный ВКМ (дцВКМ), продуцируемый клетками *in vitro* — перспективный инструмент для целей регенеративной медицины. Отсутствие клеточных компонентов обеспечивает низкую иммуногенность, а сохранение структурных и биохимических характеристик делает возможным его использование в качестве скаффолдов или имплантатов для различных типов тканей и органов. Свойства дцВКМ и состав депонированных в нём молекул зависит от многих условий, в том числе от тканевого источника клеток-продуцентов.

Для получения ВКМ используют мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) из разных тканей. Наиболее широко применяют для этих целей МСК из стромально-васкулярной фракции жировой ткани человека (жтМСК). Привлекательной альтернативой являются МСК из ткани пупочного канатика (тпкМСК).

Целью данной работы было сравнение ВКМ, продуцируемого жтМСК и тпкМСК *in vitro*.

В работе использовали МСК из стромально-васкулярной фракции и ткани пупочного канатика человека 2–4 пассажей, культивируемые в течение 21 дня в полной среде α -МЕМ с 10% эмбриональной телячьей сывороткой при 5% CO₂ + 95% воздуха (20% O₂), 37°C, 100% влажности. Клеточные пласты децеллюляризовали

с помощью раствора 0,5% Triton-X100 + 20 mM NH₄OH в PBS. Оценку структуры и характера упаковки фибрилл проводили с помощью голомографической микроскопии (TomoCube HT-X1, Южная Корея). Белковые компоненты ВКМ идентифицировали методом иммуноцитохимического окрашивания. С помощью ОТ-ПЦР в МСК определяли экспрессию генов, кодирующих белки ВКМ и матриксные металлопротеиназы. В кондиционированной среде измеряли концентрацию цитокинов, способных к депонированию в ВКМ (MAGPIX, Millipore, Германия).

Иммуноцитохимически были выявлены основные структурные белки ВКМ: коллаген, остеоонектин, фибронектин и остеопонтин. Во внеклеточном пространстве был наиболее представлен фибронектин, который образовывал волокна, чётко ориентированные вдоль клеточных тяжей. На уровне мРНК были выявлены различия в транскрипционной активности генов компонентов матрикса. В тпкМСК экспрессия генов структурных компонентов матрикса *COL1A1* (коллаген 1-го типа), *SPP1* (остеопонтин) и *SPARC* (остеоонектин) была выше, чем в жтМСК, при этом экспрессия металлопротеиназ (MMP1, MMP2) напротив была ниже. С помощью трехмерного анализа топологии ВКМ было установлено увеличение толщины и разнонаправленность волокон в слоях дцВКМ, полученного от тпкМСК по сравнению с жтМСК.

Важную роль в обеспечении функциональной активности МСК играют растворимые медиаторы, которые могут участвовать в регуляции синтеза и деградации компонентов ВКМ, а также депонироваться в нём. тпкМСК и жтМСК секретируют разный уровень цитокинов. В тпкМСК уровень GRO, VEGF, Eotaxin, MIP-1a, RANTES был ниже, а IL-6, IP-10, G-CSF, PDGF-AA, IL-1a, FGF-2 — выше, чем в жтМСК.

Таким образом, тпкМСК обладают более выраженной синтетической активностью в отношении ВКМ и могут служить альтернативным источником для получения дцВКМ. Различия по составу депонированных молекул могут влиять на биологическую активность дцВКМ, полученного от МСК из разных тканей. Результаты работы могут быть востребованы для протоколов регенеративной медицины и биотехнологии при выборе тканевых источников для создания скаффолдов/имплантов на основе дцВКМ с заданными характеристиками.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-15-00062.

Городилова А.В.¹ ✉, Абдрахманова И.И.^{1,2}, Филин И.Ю.¹, Чернов В.М.^{1,2}, Ризванов А.А.¹, Соловьева В.В.¹

Исследование противоопухолевых эффектов генетически модифицированных мезенхимных стволовых клеток жировой ткани на моделях глиобластомы *in vitro*

¹ Казанский федеральный университет, Казань, Россия

¹ ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, Россия

✉ anagorodilova@yandex.ru

Аннотация. Поиск новых подходов в терапии опухолей головного мозга является важной задачей для здравоохранения. В данном исследовании показано, что генетически модифицированные мезенхимные стволовые клетки жировой ткани человека со сверхэкспрессией TRAIL снижают жизнеспособность в отношении клеток глиобластомы человека *in vitro*.

Ключевые слова: глиобластома; клеточная терапия онкологических заболеваний; мезенхимные стволовые клетки; TRAIL.

Gorodilova A.V.¹, Abdrakhmanova I.I.^{1,2}, Filin I.Yu.¹, Chernov V.M.^{1,2}, Rizvanov A.A.¹, Solovyeva V.V.¹

Study of antitumor effects of genetically modified adipose tissue-derived mesenchymal stem cells *in vitro* in glioblastoma models

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Abstract. Finding new approaches to brain tumor therapy is an important task for public health. In this study, we show that genetically modified human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells overexpressing TRAIL reduce the viability of human glioblastoma cells *in vitro*.

Keywords: glioblastoma; cell therapy for cancer; mesenchymal stem cells; TRAIL.

Опухоли головного мозга, в частности глиобластома, являются одними из самых агрессивных онкологических заболеваний, поэтому актуальным направлением является поиск новых адъювантных подходов для терапии глиобластомы. Известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают естественным тропизмом к опухолевым клеткам и могут доставлять различные противоопухолевые агенты к опухоли и в метастатические ниши. Сверхэкспрессия мезенхимными стволовыми клетками родственного фактору некроза опухоли лиганда, индуцирующего апоптоз (TRAIL), способна усилить потенциал стволовых клеток в терапии онкологического заболевания и улучшить результаты лечения. В настоящей работе МСК были выделены из жировой ткани человека с помощью инкубации с коллагеназой (ПанЭко, Россия) в соответствии с утвержденными этическими стандартами и действующим законодательством (протокол одобрен локальным этическим комитетом КФУ, протокол № 3 от 23.03.2017). Информированное согласие было получено от каждого донора. Далее производили окрашивание антителами к CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105 с целью определения маркеров МСК. МСК были генетически модифицированы с помощью лентивирусного вектора, кодирующего TRAIL (МСК-TRAIL), в качестве контроля эффективности трансдукции проводилась параллельная трансдукция лентивирусным вектором, кодирующим зелёный флуоресцентный белок (МСК-GFP). Далее проводили культивирование клеточных линий глиобластомы человека U-138 MG (ATCC HTB-16) и SNB-19 (ATCC CRL-2219) с кондиционированной средой, полученной от МСК, МСК-TRAIL

и МСК-GFP и оценивали их пролиферацию с помощью MTS-теста (Promega, США). Также анализировали процент жизнеспособной популяции опухолевых клеток глиобластомы после 48 часов кокультивирования с МСК, МСК-TRAIL и МСК-GFP с помощью теста апоптоз (аннексин V) методом проточной цитофлуориметрии. В результате анализа данных проточной цитофлуориметрии подтвердили, что 93% популяции экспрессируют маркеры МСК: CD29, CD44, CD73, CD90 и CD105 и не экспрессируют маркеры гемопоэтических клеток. Экспрессия GFP подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии. Сверхэкспрессия TRAIL была подтверждена с помощью ПЦР в режиме реального времени и вестерн-блот-анализа. С помощью MTS-теста было показано, что пролиферация клеток U-138 MG, культивируемых в кондиционированной среде нативных МСК, составила 98%, культивируемых в среде МСК-TRAIL пролиферация снизилась до 88%. Результаты, полученные на клеточной линии SNB-19, показали снижение пролиферации для SNB-19, культивируемых в среде нативных МСК до 93 и 76% для SNB-19, культивируемых в среде МСК-TRAIL. Анализ противоопухолевого потенциала после кокультивирования клеток глиобластомы и МСК показал, что процент жизнеспособной популяции клеток U-138 MG при кокультивировании с нативными МСК снизился до 92%, тогда как показатель при кокультивировании с МСК-TRAIL составил 78%. Для линии SNB-19 данный показатель при кокультивировании с нативными МСК был 91% в отличие от кокультивирования с МСК-TRAIL — 80,5%. Полученные данные показывают, что генетически модифицированные МСК-TRAIL способны влиять на жизнеспособность с помощью секреции биологически активных факторов во внешнюю среду (в случае культивирования с кондиционированной средой), а также при прямом контакте с результатом ко-культивирования. Дальнейшие исследования в этой области помогут установить новые механизмы борьбы с глиобластомой человека. Работа выполнена в рамках программы «Стратегическое академическое лидерство Казанского федерального университета» (ПРИОРИТЕТ-2030).

Городничева Т.В.¹, Бавыкин А.С.², Молодцова А.А.², Ребриков Д.В.^{1,2} ✉

Масштабируемая система персонализированного изготовления AAV-генопрепаратов

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

✉ ncagjp4@gmail.com

Аннотация. Механизм ускоренного допуска к применению персонализированного генотерапевтического препарата позволит создавать при НМИЦах небольшие производства мощностью 50–100 генопрепаратов в год.

Ключевые слова: генотерапия; AAV; персонализация; НМИЦ.

Gorodnicheva T.V.¹, Bavykin A.S.², Molodtsova A.A.², Rebrikov D.V.^{1,2}

Scalable system for personalised AAV gene therapy

¹ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The Hospital Exemption mechanism for the use of personalized gene therapy will allow the creation of small production facilities with a capacity of 50–100 drugs per year.

Keywords: gene therapy; AAV; personalization; National Medical Research Center.

В настоящее время описано свыше 7000 орфанных наследственных заболеваний. Примерно 1% детей рождается с наследственной генетической патологией. Около 80% наследственных заболеваний имеют моногенную природу, чаще всего манифестируют в младенческом и детском возрасте, являются инвалидизирующими или летальными. Ежегодно в России рождается около 10 000 детей с моногенной наследственной патологией.

Для большинства рецессивных моногенных заболеваний единственной этиотропной терапией является доставка гена в клетки пациента (генотерапия). Наиболее перспективным и активно развивающимся сегментом генотерапевтических средств являются лекарственные препараты на основе вирусных векторов, в частности — аденоассоциированных вирусов. Однако по экономическим причинам разработка таких препаратов идёт крайне медленно. Компании не видят способов возврата огромных инвестиций в регистрацию серийно выпускаемого препарата для крайне редких заболеваний. На сегодня в мире зарегистрировано менее 20 таких препаратов. При этом 95% моногенных заболеваний скорее всего никогда не получат серийно выпускаемый зарегистрированный генотерапевтический препарат по причине коммерческой нецелесообразности.

Вместе с тем стремительное развитие молекулярно-генетических технологий позволяет выявлять генетические дефекты даже до начала клинического проявления заболевания (пример: проект генетического скрининга новорожденных «ЭКЗАМЕН»). Раннее выявление генетического нарушения в ходе запускаемых во всём мире программ полноэкзомного скрининга новорожденных создаёт предпосылки для изготовления персонализированного генотерапевтического препарата на нестандартизованной (нерутинной) основе медицинскими организациями, предназначенного для оказания медицинской помощи по жизненным показаниям конкретного пациента. При таком подходе возможно применение препарата даже до начала проявления клинических признаков заболевания (что считается золотым стандартом генотерапии).

В случае создания в России механизма допуска к применению персонализированного генотерапевтического препарата по принципу «hospital exemption» возможна организация небольших производств при крупных федеральных центрах (уровня НМИЦ) мощностью 50–100 генопрепаратов в год, включая разработку, производство и проверку безопасности препарата (без проверки эффективности). Производственный цикл в этом случае занимает порядка 6 месяцев (с проверкой безопасности на грызунах).

Важным параметром такого производства является его высокая гибкость и масштабируемость. Каждый из этапов создания препарата: сборка конструкции, наработка вируса, проверка безопасности — может быть «собран» из минимальных производственных «квантов» под конкретную производственную мощность в диапазоне 10–200 препаратов в год с ценой за одну дозу порядка 3 млн рублей.

Горохова А.В.^{1,2} ✉, Насибов Т.Ф.^{1,2}, Порохова Е.Д.^{1,2}, Старосветская А.А.², Бариев У.А.¹, Носов В.Е.³, Казанцева Е.А.⁴, Акимова Е.Б.⁴, Комарова Е.Г.⁴

Остеогенные свойства композитных кальций-фосфатных покрытий, несущих слой биodeградируемого полимера с инкорпорированным интерфероном-альфа

¹ Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

² Кафедра морфологии и общей патологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

³ Кафедра нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

⁴ Лаборатория физики наноструктурных биокompозитов, Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

✉ a.gorokhova3062@gmail.com

Аннотация. Известно, что IFN- α может оказывать неоднозначное влияние на костную ткань. В тесте эктопического остеогенеза исследованы эффекты пролонгированного высвобождения IFN- α из композитного материала на остеогенную дифференцировку мезенхимных стволовых клеток *in situ*.

Ключевые слова: остеогенез; кальций-фосфатные покрытия; интерферон- α ; мезенхимные стволовые клетки; тест эктопического остеогенеза.

Gorokhova A.V.^{1,2}, Nasibov T.F.^{1,2}, Porokhova E.D.^{1,2}, Starosvetskaya A.A.², Bariev U.A.¹, Nosov V.E.³, Kazantseva E.A.⁴, Akimova E.B.⁴, Komarova E.G.⁴

Osteogenic properties of composite calcium phosphate coatings bearing a layer of biodegradable polymer with incorporated interferon-alpha

¹ Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Department of Normal Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia

Abstract. It is known that IFN- α can have an ambiguous effect on bone tissue. The ectopic osteogenesis test examined the effects of sustained release of IFN- α from the composite material on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells *in situ*.

Keywords: osteogenesis; calcium phosphate coatings; interferon- α ; mesenchymal stem cells; ectopic osteogenesis test.

Помимо иммуномодулирующей функции в недавних исследованиях [1] показана способность интерферона-альфа (IFN- α) влиять на дифференцировку остеобластов. Однако результаты изучения действия интерферона весьма противоречивы [1–3]. Целью исследования стала оценка в эксперименте влияния IFN- α на эктопический остеогенез и гемопоз в условиях его местного высвобождения из композитных матриц-носителей. В эксперименте использовали титановые каркасы, изготовленные на базе Института физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск), на которые наносили рельефное кальций-фосфатное покрытие (СаР). На часть каркасов наносили слой гидрогеля, состоящего из биodeградируемых полиэфиров

молочной и гликолевой кислот (PLGA) в концентрациях 5 или 10%, с введением в состав интерферона-альфа (IFN) и без него [4]. Образцы стерилизовали этиленоксидом. Исследование проводили на 36 самцах мышей линии Balb/c, часть из которых ($n = 12$) была отобрана в качестве доноров сингенного костного мозга (КМ). Столбик КМ наносили *in vitro* на титановые каркасы и культивировали в течение 45 минут. Остальным животным под наркозом выполняли разрез кожи в подмышечной области, формировали боковой карман и имплантировали по одному каркасу со столбиком КМ. Было сформировано 6 групп ($n = 4$): титановые каркасы с CaP-покрытием (CaP), с CaP-покрытием и нанесенным 5% PLGA (CaP+5P), 10% PLGA (CaP+10P), а также с CaP-покрытием и PLGA в соответствующих концентрациях, модифицированным IFN (CaP+I, CaP+5P+I, CaP+10P+I). Через 45 дней животных выводили из эксперимента, из тканевых пластинок (ТП), сформировавшихся на поверхности каркасов, изготавливали гистологические препараты. На окрашенных гематоксилином и эозином срезах оценивали наличие локальной воспалительной реакции в зоне имплантации каркаса, формирование тканевых структур, подсчитывали удельную площадь (УП) сформировавшихся костной ткани (КТ) и КМ при помощи ImageJ. Статистическую обработку данных проводили в среде RStudio на языке программирования R при помощи точного теста Фишера, критерия множественного сравнения Ван дер Вердена, апостериорного теста Стила–Двасса и парного теста Бруннера–Мюнзеля. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. При проведении гистологического исследования тканей, окружающих ТП, признаков патологических реакций не обнаружено во всех группах. В группах CaP, CaP+5P, CaP+10P формирование кости и КМ происходило с одинаковой частотой (в 100% случаев). При этом для указанных групп максимальные значения УП костной ткани наблюдались в группе CaP+10P, тогда как между остальными группами различий не обнаружено. УП КМ в указанных группах была одинакова. Добавление IFN в состав CaP покрытий приводило к уменьшению частоты формирования КТ: до 75% в группе CaP+I, до 50% в группе CaP+5P+I и CaP+10P+I. Однако только в группе с 5% PLGA, модифицированным IFN, наблюдалось снижение УП КТ (почти в 2 раза относительно группы CaP). Внесение IFN в полимерный слой приводило к изменению частоты формирования КМ только в группе CaP+10P+I, в которой КТ наблюдался лишь в 50% случаев. Добавление IFN к CaP-покрытию приводило к уменьшению УП КМ в 6 раз относительно группы контроля. При внесении IFN в 5% PLGA и 10% PLGA также наблюдалось уменьшение УП КМ в 3 раза в сравнении с группой CaP. Использование PLGA в концентрации 10% увеличивает УП КТ, формирующейся *de novo* на исследуемых образцах. В свою очередь, IFN в составе CaP покрытий отрицательно влияет как на частоту эктопического формирования КТ и КМ, так и на УП КМ; система доставки PLGA+IFN несколько нивелирует местные негативные эффекты цитокина на остеогенные и кроветворные процессы.

Список литературы

1. Abukawa H., Kaban L.B., Williams W.B., et al. Effect of interferon-alpha-2b on porcine mesenchymal stem cells // J Oral Maxillofac Surg. 2006. Vol. 64, N 8. P. 1214–1220. doi: 10.1016/j.joms.2006.04.006
2. Goodman G.R., Dissanayake I.R., Gorodetsky E., et al. Interferon- α , unlike interferon- γ , does not cause bone loss in the rat // Bone. 1999. Vol. 25, N 4. P. 459–463. doi: 10.1016/S8756-3282(99)00182-9
3. Oreffo R.O., Romberg S., Virdi A.S., et al. Effects of interferon alpha on human osteoprogenitor cell growth and differentiation *in vitro* // J Cell Biochem. 1999. Vol. 74, N 3. P. 372–385. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990901)74:3<372::AID-JCB6>3.0.CO;2-H
4. Prosolov K.A., Komarova E.G., Kazantseva E.A., et al. Enhanced Corrosion Resistance and Mechanical Durability of the Composite PLGA/CaP/Ti Scaffolds for Orthopedic Implants // Polymers. 2024. Vol. 16, N 6. ID. 826. doi: 10.3390/polym16060826

Градов О.В. ✉, Градова М.А.

Пьезоэлектрические скаффолды как тераностические электроцевтики в электростимулируемой и механостимулируемой регенерации возбудимых тканей

Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ o.v.gradov@gmail.com

Аннотация. Пьезоэлектрические свойства ряда биосовместимых полимеров (ПЛА, ПГБ и др.) являются биофизической основой для регенеративной медицины будущего, включающей управление регенерацией и активными тканеинженерными конструкциями с использованием обратных связей как электрического, так и механического типа.

Ключевые слова: ПЛА; ПГБ; ПВДФ; пьезоэлектрические скаффолды.

Gradov O.V., Gradova M.A.

Piezoelectric scaffolds as theranostic electroceuticals for electrical and mechanical stimulation of excitable tissues in regenerative medicine

N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The presence of piezoelectricity in films, micro- and nanofibrils of biocompatible polymers (PLA, PHB, etc.) is the biophysical basis for regenerative medicine of the future, including the control of regeneration and tissue-engineered constructs using electrical and mechanical feedback mechanisms.

Keywords: PLA; PHB; PVDF; piezoelectric scaffolds.

В отличие от классических методов регенеративной медицины в инженерии нервной ткани, в пьезоэлектрически-активных скаффолдах и тканеинженерных конструкциях стимулятором регенерации тканей является электромеханически-активируемый материал, который может рассматриваться не только как подложка для роста клеток, но также и как наномедицинский «электроцевтик» [1–3].

В этом случае (типичном для «конвергентных технологий») смыкаются и порождают новое эмерджентное качество материала механизмы и свойства: наноустройства, стимулирующего регенерацию ткани; эндогенного биоэлектрического генератора в плоскости интерфейса мембраны возбудимой ткани и стимулирующего материала (волокна или плёнки); передачи информации по регенерируемому волокну в полях полимерного пьезо- или сегнетоэлектрика и аксональный поиск пути/аксональное наведение в условиях неизбежного в данных полях гальванотаксиса [4]. При этом неизбежно возникающая интерференция между сигналами полимерного сегнетоэлектрика (на интерфейсе с тканью) и мембранного биоэлектрического генератора возбудимой ткани (на интерфейсе с полимерным пьезоэлектриком) приводит к неделимости параметров подобных имплантируемых конструкций как электромеханических сенсоров и актуаторов. Иными словами, в силу эффективно сопряженных (на уровне границ живой ткани и наноматериала) обратных связей, имплантация данных нанобиоматериалов в ткань автоматически приводит не к одностороннему пролонгированно-терапевтическому или сенсорному эффекту, а к нанотераностике, где разделить эффект и его регистрацию уже не представляется возможным, так как и ткань является детектором стимулирующего сигнала, и пьезоэлектрический материал является электромеханическим детектором биоэлектrogenеза и биомеханической активности ткани (от механики аксонального поиска пути в нервной ткани до регуляторной сократимости в мышечной ткани).

Большую роль в этом играет согласование живой ткани и сегнетоэлектрического полимера по импедансу [5], однако этот аспект нанобиосовместимости для ПЛА, ПГБ, ПВДФ/матов из нановолокон не вполне исследован, особенно — в высокочастотной (МГц и выше) области, в силу (радио)технических ограничений. Данная инженерная и вычислительная проблема может быть решена в ближайшее время, что позволит конструировать пьезоэлектрические тераностические скаффолды, исходя из теоретических модельных результатов и прогнозов (в дискурсе мультифизического моделирования), минимизируя проблемы биосовместимости и отторжения или инкапсулирования тканью скаффолда, несогласованного с её проводящими, гидрофобными и электрогенными характеристиками.

В 2019 г. (в т.ч. в тр. Конгресса по регенеративной медицине) мы предлагали «рассматривать скаффолд одновременно как сенсор и сонар — актуатор, реализующий как электрическое (электрофизиологическое), так и... электроакустическое стимулирование ткани, а также регистрацию её собственных сигналов», что «переводит контролируемую регенерацию ткани... в раздел особого рода тераностики, где скаффолд сам является источником дескрипторов регенерации ткани, поддерживаемой им». Как показала практика зарубежной (ЕС, США, КНР) науки, данная идеология оказалась прогрессивной и актуальна до сих пор.

Список литературы

1. Forster R.J. Wirefree electroceuticals: 3D electrical and electrochemical stimulation of biological systems // *Curr Opin Electrochem.* 2023. Vol. 39. ID 101297. doi: 10.1016/j.coelec.2023.101297
2. Long Y., Li J., Yang F., et al. Wearable and implantable electroceuticals for therapeutic electrostimulations // *Adv Sci.* 2021. Vol. 8, N 8. ID 2004023. doi: 10.1002/adv.202004023
3. Maeng W.-Y., Tseng W.-L., Li S., et al. Electroceuticals for peripheral nerve regeneration // *Biofabrication.* 2022. Vol. 14, N 4. ID 042002. doi: 10.1088/1758-5090/ac8baa
4. Levin M., Selberg J., Rolandi M. Endogenous bioelectrics in development, cancer, and regeneration: drugs and bioelectronic devices as electroceuticals for regenerative medicine // *IScience.* 2019. Vol. 22. P. 519–533. doi: 10.1016/j.isci.2019.11.023
5. Кочервинский В.В., Градов О.В., Градова М.А. Фторсодержащие сегнетоэлектрические полимеры: применение в технике и биомедицине // *Успехи химии.* 2022. Т. 91, № 11. ID. RCR5037. EDN: LFXBDK doi: 10.57634/RCR5037

Гребнев Д.Ю.^{1,2} ✉, Иванов В.А.¹, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Базарный В.В.¹, Гаврилов И.В.^{1,2}

Активации регенерации миелоидной ткани после воздействия ионизирующего излучения с использованием стволовых клеток с измененной в них аутофагией

¹ ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия

² ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

✉ dr-grebnev77@mail.ru

Аннотация. Введение мезенхимальных стромальных клеток с активированной в них аутофагией способствовало в большей степени восстановлению активности гемопоэза после воздействия ионизирующего излучения по сравнению с введением этих клеток без моделирования в них аутофагии.

Ключевые слова: Мезенхимальные стромальные клетки; аутофагия; гемопоэз; ионизирующее излучение.

Grebnev D.Yu.^{1,2}, Ivanov V.A.¹, Maklakova I.Yu.^{1,2}, Bazarnyi V.V.¹, Gavrilov I.V.^{1,2}

Activation of myeloid tissue regeneration after exposure to ionizing radiation using stem cells with altered autophagy

¹ FSBEI HE USMU of the Ministry of Health of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russia

² SAHI SR «Institute of Medical Cell Technologies», Yekaterinburg, Russia

Abstract. The introduction of mesenchymal stromal cells with autophagy activated in them contributed to a greater degree to the restoration of hematopoiesis activity after exposure to ionizing radiation compared with the introduction of these cells without modeling autophagy in them.

Keywords: Mesenchymal stromal cells; autophagy; hematopoiesis; ionizing radiation.

В связи с высокой эффективностью в отношении ингибирования опухолевого роста воздействие ионизирующего излучения (ИИ) широко используется для терапии онкологических заболеваний. Однако возникающие при этом побочные эффекты в виде торможения пролиферативной активности и гибели нормальных клеток, необходимость активации регенерации миелоидной ткани остаются актуальной проблемой. Восстановление гемопоэза после воздействия ИИ осуществляется за счет выживших радиочувствительных прогениторных и радиорезистентных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). В поддержании жизнеспособности, активации пролиферации ГСК, активации регенерации миелоидной ткани путем выработки биологически активных веществ (БАВ), формирования межклеточных контактов участвуют мезенхимальные стромальные клетки (МСК) [1]. В настоящее время доказана способность МСК стимулировать восстановление гемопоэза. Тем не менее остается актуальной проблема повышения выживаемости МСК после миграции их в костный мозг (КМ) и повышения их секреторной активности. Одним из способов повышения терапевтического потенциала МСК может быть изменение в них аутофагии [2]. В то же время накопленный экспериментальный материал по этой теме противоречив. В ряде исследований показано, что активация аутофагии в МСК приводит к повышению их пролиферативной активности, увеличению выработки ими БАВ, в других исследованиях получены противоположные данные.

Исследование проведено на 110 мышах-самцах возраста 12–14 нед. Было выделено 6 групп по 10 животных в каждой: 1 группа — интактные животные; Животные остальных пяти групп подверглись воздействию ИИ в дозе 5,0 Гр. 2 группа (контрольная) — животные, которым не проводилась трансплантация клеток. Остальным животным через 1 час после воздействия ИИ внутривенно были трансплантированы

ММСК в количестве 1×10^6 клеток/мышь. Животным 3 группы вводили МСК без изменения в них аутофагии; 4-й группы — МСК с активированной в них mTOR-зависимой аутофагией (рапамицин 3 мкмоль/л); 5-й группы — МСК с активированной в них mTOR-независимой аутофагией (трегалоза 100 мкмоль/л); 6-й группы — МСК с ингибированной в них аутофагией (3-метиладенин 10 мкмоль/л). С целью определения выраженности аутофагии в лизате МСК методом ИФА было определено содержание LC3b и Beclin1, а также mTOR.

Животные были выведены из эксперимента на 7 и 21 сутки после воздействия ИИ. Производился анализ миелограммы, общего анализа крови, во внеклеточной фракции костного мозга методом ИФА оценивалось содержание Flt3 ligand, SCF, G-CSF.

Трансплантация МСК с активированной в них аутофагией вызывает повышение содержания в костном мозге Flt3 ligand, SCF, G-CSF. Уровень гемопоэтических факторов был выше после введения МСК с активированной mTOR независимой аутофагией по сравнению с mTOR-зависимой аутофагией. После введения МСК с ингибированной аутофагией содержание SCF в КМ было меньше на 28,8% (7 сут) и 19,9% (21 сут), а Flt3 ligand и G-CSF не отличалось по сравнению с введением МСК без моделирования аутофагии. Трансплантация МСК с активированной аутофагией на 7-е и 21-е сутки вызвала активацию тромбоцитопоза и эритропоза. Введение МСК без измененной в них аутофагии стимулировало гранулоцитопоз и лимфопоз, но в меньшей степени, чем после активации аутофагии. Ингибирование аутофагии в МСК приводило к снижению терапевтического эффекта МСК в отношении активации гранулоцитопоза и лимфопоза. Трансплантация клеток с активированной в них mTOR независимой аутофагией в большей степени стимулировало гемопоз, чем после введения МСК с активированной в них mTOR-зависимой аутофагией.

Активация аутофагии в МСК повышает их терапевтический потенциал в отношении восстановления регенерации миелоидной ткани после воздействия ИИ. Активация аутофагии mTOR независимым путём является более предпочтительной по сравнению с mTOR-зависимой.

Список литературы

1. Mathew S.A., Naik C., Cahill P.A., Bhonde R.R. Placental mesenchymal stromal cells as an alternative tool for therapeutic angiogenesis // *Cell Mol Life Sci.* 2020. Vol. 77, N 2. P. 253–265. doi: 10.1007/s00018-019-03268-1
2. Liu S., Yao S., Yang H., et al. Autophagy: Regulator of cell death // *Cell Death Dis.* 2023. Vol. 14, N 10. ID 648. doi: 10.1038/s41419-023-06154-8

Григорьев Т.Е.^{1,2} ✉, Антипова К.Г.¹, Загоскин Ю.Д.¹, Крупнин А.Е.¹, Храмцова Е.А.³, Ужакова Э.А.²,
Базылева К.Ю.¹, Фомина Ю.С.¹, Чвалун С.Н.¹

Функциональные полимерные материалы для тканевой инженерии: структура и свойства

¹ НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

³ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия

✉ timgrigo@yandex.ru

Аннотация. В работе отражены основные подходы к созданию пористых материалов с регулируемой структурой, механическими характеристиками и биоактивностью: волокнистых нетканых, губчатых и гидрогелевых. Показаны как синтетические подходы, так и методики формирования различных материалов.

Ключевые слова: биополимеры; биомеханическое поведение; пористые материалы; гидрогели; нетканые материалы; биосовместимость; биоразлагаемые полимеры.

Grigoriev T.E.^{1,2}, Antipova K.G.¹, Zagoskin Y.D.¹, Krupnin A.E.¹, Khramtsova E.A.³, Ujakova E.A.²,
Bazyleva K.U.¹, Fomina U.S.¹, Chvalun S.N.¹

Functional polymeric materials for tissue engineering: structure and properties

¹ NRC "Kurchatov institute", Moscow, Russia

² MIPT, PHYSTECH, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ IBCP RAS, Moscow, Russia

Abstract. This work shows the main approaches to the creation of porous materials with controlled structure, mechanical characteristics and bioactivity: fibrous non-woven, sponge and hydrogel. Both synthetic approaches and methods for forming various materials are shown.

Keywords: biopolymers; biomechanical behavior; porous materials; hydrogels; nonwoven materials; biocompatibility; biodegradable polymers.

Развитие современных технологий лечения определяется использованием междисциплинарных подходов к созданию новых материалов и изделий, базирующихся на функциональных полимерах, металлах, композитах, в том числе наноструктурированных. Важнейшее требование к таким материалам — их биосовместимость. Для создания искусственной ткани используют клетки донора и искусственный матрикс, как физическую основу и субстрат для роста этих клеток. Важнейшей научной задачей, которую необходимо решить для достижения данной цели, является создание ряда подходов формирования биоискусственных клеточных систем, или тканеинженерных конструкций.

Сегодня основные подходы к созданию пористых материалов с регулируемой структурой, механическими характеристиками и биоактивностью состоят в получении различных матриксов: волокнистых нетканых, губчатых и гидрогелевых. Для оценки требуемых структуры и свойств необходимо систематически исследовать структуру и биомеханическое поведение ряда тканей и органов, нативных и децеллюляризованных: кожи, трахеи, диафрагмы, аорты, желчного протока, легких, сердца, почек. В рамках работы показано влияние процессов децеллюляризации и рецеллюляризации на стабильность к циклическим нагрузкам: при удалении клеточных компонент ткань теряет способность претерпевать многократные циклические

деформации без потери прочности. В то время как рецеллюляризация приводит к восстановлению стабильности при циклических нагрузках.

Для создания биомеханически адекватных гидрогелей предложена методика определения параметров упругости гидрогелей с привлечением испытаний на одноосное растяжение, сжатие, кручение и бесконтактного метода определения коэффициента Пуассона. Полученные значения параметров упругости верифицированы в экспериментах на индентирование. Значения модуля сдвига, полученные в ходе аппроксимации деформационных кривых растяжения моделями гиперупругого поведения, совпадают с экспериментальными значениями.

В работе отражены основные направления варьирования структуры и пористости полимерных и композиционных материалов, необходимые для работ в области тканевой инженерии. Показано как синтетические подходы, так и методики формования различных материалов.

Разработаны новые способы получения гидрогелей на основе синтезированных тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля с молекулярной массой от 11 до 42 кДа. Показано, что «быстрое» ухудшение качества растворителя приводит к получению однородных эластичных гидрогелей с модулями упругости до 50 кПа, в то время как при «медленном» ухудшении качества растворителя получают пористые гидрогели с модулями упругости, достигающими 4,5 МПа.

Разработана новая методика получения пористых материалов на основе полилактида и его сополимеров с этиленгликолем, позволяющая получать изотропные материалы с пористостью до 98% и диаметром пор до 150 мкм. Показано, что состав и пористость материалов существенным образом влияет как на их механические характеристики (значения модуля упругости лежат в диапазоне 0,9–24 МПа), так и на биосовместимость. Выявленная воспалительная реакция, наблюдаемая в *in vivo* испытаниях при положительных результатах *in vitro*, отражает важность соответствия физико-механических характеристик материалов и тканей организма в месте имплантации.

Разработана методика получения пористых частиц на основе полилактида и хитозана с импрегнированным в них костным морфогенетическим белком. Исследования кинетики высвобождения белка в зависимости от природы и размеров частиц показали, что полилактидные частицы способны увеличить срок его высвобождения вплоть до 6 суток.

Использование пористых микрочастиц на основе полилактида в качестве наполнителя для термоотверждаемых гидрогелей на основе хитозана и коллагена позволило на 2 порядка увеличить модуль упругости системы.

Разработана методика модификации нетканого волокнистого материала природными полимерами для получения биоподобной структуры внеклеточного матрикса с сохранением высокой пористости. Подтверждено, что внедрение в волокнистую матрицу коллагена и хитозана приводит к гидрофилизации поверхности и формированию среды, пригодной для заселения водорослевыми клеточными культурами. Снижение пористости композиционного материала на 1% за счет добавления природного губчатого наполнителя приводит к 5-кратному росту упруго-прочностных свойств материала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения № 075-15-2023-324.

Гринчук Т.М. ✉, Шорохова М.А.

Роль цитогенетического анализа при использовании мезенхимных стволовых клеток в регенеративной медицине

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ grintat@bk.ru

Аннотация. Проведен цитогенетический анализ мезенхимных стволовых клеток (МСК) эндометрия на разных сроках их культивирования и сравнение полученных данных с соответствующими литературными для МСК из других источников, выявившие роль типов хромосомных дефектов в развитии онкогенного потенциала.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; цитогенетический анализ; кариотипическая нестабильность; хромосомные перестройки.

Grinchuk T.M., Shorokhova M.A.

The role of cytogenetic analysis in the use of mesenchymal stem cells in regenerative medicine

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Cytogenetic analysis of endometrial mesenchymal stem cells (MSCs) at different passages and comparison of the obtained data with the corresponding literature for MSCs from other sources were performed, revealing the role of the type of chromosomal defects in the development of oncogenic potential.

Keywords: mesenchymal stem cells; cytogenetic analysis; karyotypic instability; chromosomal rearrangements.

Использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) в медицинских целях в качестве инструмента, способствующего регенерации и восстановлению поврежденных тканей подразумевает их генетическую безопасность. Риски при трансплантации генетически недоброкачественного биоматериала связан с нарушением его генетической стабильности, возможной при переводе клеток из системы *in vivo* в систему *in vitro*. К числу причин, способных нарушить структуру генома МСК относят разнотипные экзогенные стрессы, приводящие к сбоям в программе клеточного деления. К стрессорным факторам относят способ пересева клеток, плотность культуры, реактивы, культуральные среды, температурный режим, влажность, насыщение клеток кислородом, продолжительность культивирования, человеческий фактор и другие. Цитогенетический анализ G-бандированных метафазных хромосом, позволяет оценить уровень стабильности генетического аппарата на кариотипическом уровне. Появление в клеточной культуре анеуплоидных вариантов, в том числе с увеличенным числом хромосомных копий, усиливающих экспрессию определенных генов, и хромосомных перестроек, приводящих к изменению положения генов, может стать индуктором активации про- и онкогенов. Проведенный в настоящей работе цитогенетический анализ ряда линий эндометриальных мезенхимных стволовых клеток (эМСК), полученных в лаборатории внутриклеточной сигнализации и транспорта ИНЦ РАН, на разных этапах их культивирования выявил наличие таких кариотипических дефектов, как анеуплоидия (редко), межхромосомные ассоциации (исчезают с пассажами), прицентромерные и терминальные поломки (с делетированием, либо сохранением генетического материала, незакономерные). Частота выявленных дефектов носит линейный характер. Культура с редкими кариотипическими дефектами на ранних пассажах (пас. 4, 6) в дальнейшем (п. 15) становилась стабильной. Молекулярный анализ проанализированных клеточных линий онкогенного потенциала в них не выявил. Согласно литературным данным, спектр цитогенетических дефектов, описанных при детальном кариотипировании МСК других источников (костного

мозга, Вартонова студня, жировой ткани, пульпы зуба), является более разнообразным, чем в линиях эМСК. Характер выявленных хромосомных перестроек (межхромосомные транслокации, кольцевые хромосомы, перичентрические инверсии, дупликации, дицентрические хромосомы, типичного для опухолевых клеток наличие дополнительного генетического материала амплификационного характера) свидетельствует о том, что использование такого клеточного материала является менее безопасным с точки зрения развития онкогенного потенциала. Кроме того, набор кариотипических дефектов в этих клетках с пассажами может меняться, не исключено наличие перестроенных маркерных хромосом. Полученные в настоящей работе и накопленные литературные данные позволяют сделать вывод о том, что при использовании МСК в регенеративной медицине необходим их цитогенетический анализ, неотъемлемой частью которого является выяснение генетического фонда изменчивости используемых в медицинских целях клеток. Это может быть достигнуто только при неоднократном кариотипировании подготавливаемого к трансплантации биоматериала на разных этапах культивирования клеток. С учетом этих знаний необходим также цитогенетический контроль МСК перед процедурой их трансплантации.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 21-74-20178.

Громова Е.С.^{1,2} ✉, Переплетчикова Д.А.¹, Карелкин В.В.³, Малашичева А.Б.^{1,2}

Влияние динамических изменений уровня транскрипционного фактора Runx2 на остеогенную дифференцировку клеток и сигнальный путь Notch

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Российский национальный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия

✉ kate.gromova01@mail.ru

Аннотация. Данное исследование направлено на изучение динамических изменений уровня транскрипционного фактора Runx2, его взаимодействия с сигнальным путём Notch и влияния на остеогенную дифференцировку клеток.

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка клеток; динамика активации Runx2; сигнальный путь Notch.

Gromova E.S.^{1,2}, Perepletchikova D.A.¹, Karelkin V.V.³, Malashicheva A.B.^{1,2}

The effect of dynamic changes in the level of Runx2 transcription factor on osteogenic cell differentiation and the Notch signaling pathway

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ Russian National Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R.R. Vreden, Saint Petersburg, Russia

Abstract. This study is aimed at studying the dynamic changes in the level of the transcription factor Runx2, its interaction with the Notch signaling pathway and its effect on osteogenic cell differentiation.

Keywords: osteogenic cell differentiation; dynamics of Runx2 activation; Notch signaling pathway.

Runx2 является транскрипционным фактором и главным регулятором остеогенной дифференцировки. Он взаимодействует с сигнальными путями, такими как Wnt, Bmp, Hippo/Yap и Notch [1]. По некоторым данным сигнальный путь Notch является негативным модулятором Runx2 [2]. Механизмы регуляции Runx2, динамика активации в ходе остеогенной дифференцировки и его связь с другими генами, связанными с остеогенной дифференцировкой, остаются не вполне ясными и в частности невыясненными остаются механизмы взаимодействия между Runx2 и Notch. Выяснение этих вопросов актуально для понимания регенерации костной ткани и потенциальных терапевтических разработок, имеющих целью усиление остеогенеза. Цель данного исследования состояла в изучении динамики активации Runx2 на уровне РНК и белка на ранних этапах остеогенной дифференцировки и анализе связи активации Runx2 и сигнального пути Notch.

В качестве экспериментальной модели использовали первичные остеобласты человека, полученные из фрагментов губчатой части бедренной кости. В НИИЦТО им. Вредена. Клетки культивировали *in vitro* в стандартных условиях; для индукции остеогенной дифференцировки в среду культивирования добавляли факторы остеогенной дифференцировки — дексаметазон, бета-глицерофосфат и аскорбиновую кислоту. Оценку дифференцировки проводили путем окрашивания культур специфическим красителем ализариновым красным через 12–20 дней после индукции. Для активации гена *RUNX2* была использована лентивирусная конструкция, несущая полноразмерный ген; для подавления экспрессии *RUNX2* использовали лентивирусную

конструкцию, несущую малую шпилечную РНК к этому гену. Оценка уровня экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени; уровень белка анализировали методом вестернблоттинга. Для стабилизации уровня белка использовали ингибитор протеасомной деградации MG132.

Анализ уровня РНК и белка проводили через 6, 12 и 24 ч и 7 суток после индукции дифференцировки. Уровень РНК *RUNX2* возрастал в 2–3 раза уже через 6 часов после индукции и далее практически не изменялся в ходе дифференцировки. Напротив, уровень белка имел резко выраженный пик через 6–12 часов после индукции, затем падал через 24 часа и затем возрастал в 1,5–2 раза через 7 суток после индукции. Внесение активирующих лентивирусных конструкций приводило к накоплению РНК гена *RUNX2*, а инактивирующих — к небольшому снижению. При этом введение *RUNX2* приводило к небольшому дозо-зависимому усилению остеогенной дифференцировки, выявляемому ализариновым красным. Стабилизация уровня белка при обработке клеток ингибитором MG132 приводила к накоплению белка Runx2 в клетках и к усилению остеогенной дифференцировки также дозо-зависимо при увеличении времени экспозиции с ингибитором с 6 до 24 часов. На ранних этапах дифференцировки происходило накопление транскриптов гена *HEY1* и соответствующего белка, что свидетельствовало об активации сигнального пути Notch на самых ранних этапах остеогенной дифференцировки. Стабилизация белка Runx2 в результате ингибирования протеасомной деградации также приводила к увеличению содержания белка Hey1. Всё это свидетельствует в пользу взаимодействия Runx2 с сигнальным путем Notch в ходе остеогенной дифференцировки, но детали этого взаимодействия остаются предметом дальнейших исследований.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что на ранних этапах индукции остеогенной дифференцировки, по-видимому, определяющим является уровень белка Runx2. Мы полагаем, что именно временное, тонко регулируемое накопление белка Runx2, является критическим для индукции остеогенной дифференцировки.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (№ проекта 23-15-00320).

Список литературы

1. Rutkovskiy A., Stenslökken K.-O., Vaage I.J. Osteoblast differentiation at a glance // *Med Sci Monit Basic Res.* 2016, Vol. 22, P. 95–106. doi: 10.12659/MSMBR.901142
2. Garg V., Muth A.N., Ransom J.F., et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease // *Nature.* 2005. Vol. 437, N 7056. P. 270–274. doi: 10.1038/nature03940

Грошева А.Г., Куралесова А.И.✉, Генкина Е.Н.

Как это было. История открытия стволовых стромальных клеток и разработка метода их культивирования

ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

✉ alla.kuralesova@yandex.ru

Аннотация. Разработанный Р.К. Чайлахяном метод культивирования стволовых стромальных клеток и изучения их репаративных возможностей открыл перспективы использования этих клеток в медицине.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки (МСК); костный мозг; культивирование МСК; обратная трансплантация.

Grosheva A.G., Kuralesova A.I., Genkina E.N.

How it was. The history of stromal stem cells and the development of a method for their cultivation

N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. The method developed by R.K. Chilakhyan for the cultivation of stromal stem cells and the study of their reparative capabilities has opened up prospects for the use of these cells in medicine.

Keywords: mesenchymal stromal cells (MSCs); bone marrow; MSCs cultivation; reverse transplantation.

Р.К. Чайлахян родился 19 ноября 1937 г. в Ереване, там же окончил среднюю школу. В Харькове, окончил медицинский институт в 1961 г. Работал врачом, а в 1964 г. поступил в аспирантуру НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР, где профессор М.А.Туманян, заведующая отделом радиационной иммунологии была его первым руководителем. Работая в лаборатории Р.К. Чайлахян выращивал костный мозг крыс в культуральных флаконах. Неоднократно он обращал внимание на появлявшиеся в культурах плотные скопления клеток в виде очагов. По рекомендации М.А. Туманян Р.К. Чайлахян обратился к А.Я. Фриденштейну, известному иммунологу, для обсуждения полученного феномена. Эта встреча оказалась судьбоносной. Сотрудничество двух талантливых исследователей дало научной общественности как понимание клеточных основ формирования стромы кроветворных и лимфоидных органов, так и метода их культивирования. В дальнейшем Р.К. Чайлахян усовершенствовал метод культивирования стволовых стромальных клеток (МСК, мезенхимальные стволовые клетки — современный термин) и вплотную занялся изучением их свойств, что практически определило тематику лаборатории иммуноморфологии на последующие годы. Р.К. Чайлахян руководил лабораторией стромальной регуляции иммунитета с 1993 г. Разработаны под его руководством методы культивирования и исследования стволовых стромальных клеток. Появились научные статьи Р.К. Чайлахяна [1] и А.Я. Фриденштейна [2] с экспериментальными данными о том, что во взрослом организме действительно существуют стволовые клетки стромы костного мозга, выявляющиеся в культурах. Значимость этих клеток и особенно методов их культивирования оказалась столь велика, что все еще растет количество лабораторий в России и за рубежом, работающих в этом направлении. Научные результаты, полученные Р.К. Чайлахяном, позволили создать и внедрить в клинику метод замещения костных дефектов путем аутотрансплантации остеогенных клеток костного мозга, выращенных *in vitro* (Патент на изобретение № 2167662) [3]. Не менее актуальным является проблема восстановления целостности гиалинового хряща при травмах коленного и более крупных суставов. Метод восстановления гиалинового хряща суставов основан на предложенном Р.К. Чайлахяном биотехнологическом принципе — трансплантации в сустав аутологичных клеток-предшественников, выращенных вне организма (патент на изобретение №2142285).

Оба метода были удостоены золотой медали на международной выставке изобретений и открытий в Брюсселе (диплом: Брюссель 20/11/2000) [4]. Приоритетными также являются одни из последних данных использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в тканеинженерных конструкциях, замещающих разрыв ахиллова сухожилия и обеспечивающих полную регенерацию ткани сухожилия через 6 месяцев [5]. Такой метод может быть активно востребован в медицинской практике. Стромальные клетки оказались удивительными в плане репаративных возможностей как на уровне клеток, так и использования секрета и его отдельных компонентов. Р.К. Чайлахян организовывал и проводил совместные исследования не только с лабораториями Института, но и с научными и клиническими центрами РАН. Был разработан тест на эффективность клонирования стволовых стромальных клеток при патологии в качестве диагностического, определяющего регенеративный потенциал клеток костного мозга («Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. академика Г.А. Илизарова» МЗ РФ). В период работы с людьми, пострадавшими в Чернобыле он также использовался для диагностики возможности восстановления у облученных людей (Государственный научный центр ФМБЦ им. А.И. Бурназяна). Проводились совместные работы с Институтом фотонных технологий РАН Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН (Москва, Троицк), Отделениями пульмонологии ФМБА, Институтом биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, кафедрами Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (кафедра оперативной хирургии и патологической анатомии, кафедра травматологии и ортопедии), и Институтом биохимии Национальной Академии наук Республики Армения. На сегодняшний день исследования в данных направлениях перспективны. Сегодня перечисленные технологические находки могут использоваться в регенеративной медицине. Многие годы Р.К. Чайлахян был членом редколлегии журнала «Гены и клетки», был членом правления научного общества «Регенеративная медицина». Он возглавлял Московское отделение межрегиональной ассоциации по клеточным технологиям и регенеративной медицине, долгое время являлся экспертом научных проектов РФФИ и РФФ.

Р.К. Чайлахян награжден почетным знаком «Отличник здравоохранения» и медалью «Ветеран труда». На мемориальной сессии III Национального Конгресса по регенеративной медицине 15—18 ноября 2017 года ему была вручена памятная медаль № 01 члена-корреспондента Академии наук, профессора А.А. Максимова и мантия ученого исследователя. Благодаря методу, разработанному Р.К. Чайлахяном, стало возможным расширить применение стромальных клеток разных органов. Не каждому ученому удается открыть новое направление развития научного поиска. Р.К. Чайлахяну это удалось.

Список литературы

1. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки // ДАН СССР. 1969. Т. 187, № 2. С. 473–479.
2. Friedenstain A.J., Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // Cell Tissue Kinet. 1970. Vol. 3, N 4. P. 393–403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
3. Осемян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., и др. Лечение несросшихся переломов ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных *in vitro* и имплантированных в АГМ // Ортопедия, травматология и протезирование. 1987. № 9. С. 59–61.
4. Чайлахян Р.К., Герасимов Ю.В. Стволовые стромальные клетки костного мозга: экспериментальные исследования и применение // Медицинская иммунология. 2004. Т. 6, № 3-5. С. 201–205. EDN: JUIYYJ
5. Chailakhyan R.K., Kon E., Shekhter A.B., et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells provide complete regeneration in a rabbit model of the Achilles tendon bundle rupture // Int Orthop. 2021. Vol. 45. P. 3263–3276. doi: 10.1007/s00264-021-05168-1

Груздева О.В.✉, Учасова Е.Г., Дылева Ю.А., Слесарева Т.А., Синицкий М.Ю., Матвеева В.Г., Горбатовская Е.Е., Долматова С.Е.

Оценка остеогенного потенциала мезенхимальных стволовых клеток эпикардиальной жировой ткани у пациентов с ишемической болезнью сердца

ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

✉ o_gruzdeva@mail.ru

Аннотация. МСК ЭЖТ способны к остеобластной дифференцировке, что подтверждается экспрессией костных генов — маркеров. Мы установили, что в клетках пациентов с ИБС экспрессируются костноспецифические гены, даже в отсутствие остеоиндукторов в культуральной среде.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; RUNX2; Osterix; остеокальцин; эпикардиальная жировая ткань; ишемическая болезнь сердца.

Gruzdeva O.V., Uchasova E.G., Dyleva Yu.A., Slesareva T.A., Sinitsky M.Yu., Matveeva V.G., Gorbatovskaya E.E., Dolmatova S.E.

Assessment of osteogenic potential of mesenchymal stem cells of epicardial adipose tissue in patients with coronary artery disease

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract. MSC EAT are capable of osteoblastic differentiation, which is confirmed by the expression of bone marker genes. We found that bone-specific genes are expressed in the cells of patients with CAD, even in the absence of osteoinducers in the culture medium.

Keywords: mesenchymal stem cells; RUNX2; Osterix; osteocalcin; epicardial adipose tissue; coronary artery disease.

На сегодняшний день, одним из приоритетных для изучения направлений в области кардиологии, является этиология и патогенез образования кальцификации стенки сосудов и клапанов сердца. Показано, что процесс кальцификации представляет собой строго регулируемый процесс, стадии развития которого аналогичны костному морфогенезу, включая экспрессию основных проosteогенных факторов, таких как остеокальцин, остеопротегерин, остеоопонтин и других маркеров [1]. Точные механизмы патогенеза кальцификации коронарных артерий до сих пор не ясны. Источником остеобластов в сердечно-сосудистой системе могут служить мезенхимальные стволовые клетки (МСК), локализующиеся в жировой ткани (ЖТ), окружающей сердце и сосуды [2]. Предполагается, что основная функция МСК ЖТ заключается в регенерации поврежденных участков окружаемого органа, выработке биологически активных веществ, антиапоптотических, ростовых и иммуномодулирующих факторов. В тоже время, являясь мультипотентными клетками МСК ЖТ обладают свойством дифференцироваться в остео- хондро- и адипогенные линии [3]. Имеющиеся публикации свидетельствуют, что паракринная активность МСК ЖТ, заключающаяся в продукции факторов роста и цитокинов, оказывает влияние на индуцирование ангиогенеза и повышение выживаемости кардиомиоцитов [2]. Однако количество информации о функции МСК ЖТ, окружающей сердце и сосуды, в особенности о их роли в патогенезе сосудистой кальцификации, ограничено. Целью данной работы являлось оценить уровни экспрессии генов и белков — маркеров остеогенеза в МСК ЭЖТ пациентов с ИБС при культивировании в остеогенной среде, в сравнении с МСК ЭЖТ, культивируемых в стандартных условиях. МСК получали из биоптатов ЭЖТ 5 пациентов в возрасте до 75 лет, с диагнозом

ИБС. Клетки культивировали до 3-го пассажа, после чего индуцировали остеогенную дифференцировку с использованием остеогенной среды. В качестве контроля использовались МСК, не подвергшихся дифференцировке. Остеогенный потенциал оценивали на 15-й день культивирования путем определения уровня мРНК специфических остеогенных генов (*RUNX2* (кодирует одноименный транскрипционный фактор), *SP7* (кодирует транскрипционный фактор Osterix), *BGLAP* (кодирует остеокальцин), *ALPL* (кодирует специфичную изоформу щелочной фосфатазы), *SPP1* (кодирует остеоопонтин)) методом ПЦР в реальном времени и белков *RUNX2*, остеоопонтин (OPN), остеокальцин (OCN), Osterix, методом иммунофлуоресцентного окрашивания. Было установлено, что активация транскрипции костноспецифических генов присутствовала как в клетках, культивируемых в остеогенной среде, так и в интактной культуре. Экспрессия ключевого остеогенного фактора *RUNX2* в клетках, культивированных в среде с остеоиндукторами была в 1,9 раза выше, чем в недифференцированных МСК. Аналогичные результаты были получены в отношении уровня экспрессии *SPP1*, который, так же, как и *RUNX2* экспрессируется на ранних этапах дифференцировки МСК в остеобласты. Так, экспрессия гена *SPP1* была в 1,4 раза выше в МСК, культивированных в присутствии остеогенной среды, чем в контроле. В то время как экспрессия генов остеокальцина (*BGLAP*) и Osterix (*SP7*) не отличалась между дифференцированными и недифференцированными культурами МСК. Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания показали, что в культуре МСК ЭЖТ, полученной на 15-е сутки после инкубации с остеобластной средой, по сравнению с контрольными МСК наблюдалось значимое увеличение *RUNX2* и OPN в индуцированных остеогенной средой МСК, чем в контрольных культурах клеток в 1,6 раза. Стоит отметить, что методом иммунофлуоресцентной окраски нами не было выявлено различий в экспрессии Osterix и OCN между культурами. Таким образом, МСК ЭЖТ способны к остеобластной дифференцировке, что подтверждается экспрессией костных генов — маркеров. Мы установили, что в клетках пациентов с ИБС экспрессируются костноспецифические гены, даже в отсутствие остеоиндукторов в культуральной среде. Полученные данные, могут служить базой для дальнейших исследований в этом направлении.

Список литературы

1. Костина Д.А., Успенский В.Е., Семенова Д.С., и др. Молекулярные механизмы сосудистой кальцификации // Трансляционная медицина. 2020. Т. 7, № 1. С. 6–21. EDN: PTBGSS doi: 10.18705/2311-4495-2020-7-1-6-21
2. Krawczenko A., Klimczak A. Adipose tissue-derived mesenchymal stem/stromal cells and their contribution to angiogenic processes in tissue regeneration // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23, N 5. ID 2425. doi: 10.3390/ijms23052425
3. Нирицкий П., Сагардзе Г.Д., Ефименко А.Ю., и др. Ниша стволовой клетки // Цитология. 2018. Т. 60, № 8. С. 575–586. EDN: XZJBED doi: 10.31116/tsitol.2018.08.01

Губский И.Л.^{1,2} ✉, Докукин Н.В.¹, Шкап М.О.¹, Кибирский П.Д.¹, Наместникова Д.Д.^{1,2},
Губский Л.В.^{1,2}, Баклаушев В.П.^{1–4}

Корреляция данных МР-трактографии при травме спинного мозга с данными гистологического исследования плотности соединительной ткани

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

⁴ ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи ФМБА России, Москва, Россия

✉ gubskiy.ilya@gmail.com

Аннотация. Магнитно-резонансная трактография является многообещающим методом неинвазивной оценки белого вещества ЦНС. Однако данный метод обладает большим количеством подводных камней. Целью данной работы стал небольшой аспект оценки данных МР-трактографии с данными гистологического исследования для оценки плотности соединительной ткани.

Ключевые слова: МР-трактография; гистология; повреждение спинного мозга; окраска по Ван-Гизону.

Gubskiy I.L.¹, Dokukin N.V.¹, Shkap M.O.¹, Kibirsky P.D.¹, Namestnikova D.D.^{1,2}, Gubsky L.V.^{1,2}, Baklaushev V.P.^{1–4}

Correlation of MRI tractography data with histological findings on connective tissue density in spinal cord injury

¹ Federal Center for Brain and Neurotechnologies, FMBA of Russia, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Federal Clinical and Research Center for Specialized Medical Care, FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Magnetic resonance tractography is a promising method for noninvasive investigation of CNS white matter. However, this method can yield many pitfalls. The aim of this work was a small aspect of evaluating MR tractography results with histological data to determine the density of connective tissue.

Keywords: MR-tractography; histology; spinal cord injury; Van Gieson's stain.

Магнитно-резонансная трактография является современным методом неинвазивного изучения проводящей системы центральной нервной системы. Несмотря на объективные плюсы метода и его широкое применение в научной работе, у МР-трактографии существует большое количество технических ограничений. К ним можно отнести не высокое пространственное разрешение и возможность визуализировать только пучки белого вещества, высокую чувствительность к однородности магнитного поля и артефактам, зачастую долгое время сканирования для получения адекватного качества данных, использование сложных методов обработки данных на этапе их подготовки и анализа и многое другое. В связи с этим исследование спинного мозга с использованием МР-трактографии всегда является вызовом для исследователя, а получаемые данные всегда необходимо критически анализировать на возможность получения не адекватных результатов. Целью данной работы было нахождение возможных корреляций между данными МР-трактографии и плотностью соединительной ткани при исследовании спинного мозга с моделью контузионной травмы.

В качестве исследуемого объекта выступали выделенные препараты спинного мозга экспериментальных животных (карликовые свиньи) выделенные на 90-е сутки после моделирования травмы (с использованием

импактора). Часть животных так же подвергалась экспериментальному лечению с использованием мезенхимальных стволовых клеток. После фиксации препаратов в растворе формалина в течение 2–5 суток проводилась МР-трактография. Далее, для анализа соединительной ткани в образцах производилась их подготовка и окраска по Ван-Гизону.

Магнитно-резонансная-трактография выполнялась на томографе для малых лабораторных животных ClinScan (Bruker BioSpin) с индукцией магнитного поля 7 Тл. Образец спинного мозга после выделения дегазировался в течение 12 часов для элиминации пузырьков газа, после чего помещался в 15 мл пробирку, заполненной формалин. Сканирование осуществлялось в объемной приемно-передающей РЧ-катушке для исследования мозга мышей. Использовалась двухмерная импульсная эхопланарная последовательность на основе спинового эха с включенными диффузионными градиентами и следующими настройками: размер вокселя $0,25 \times 0,25 \times 0,3$ мм, TR/TE = 24000/30 мс, поле обзора 16 мм, количество усреднений 24, количество срезов 75, количество диффузионных направлений 64, b-factors 0 и 1500 с/мм², общее время сканирования одного образца 10 часов 24 минуты. Всего было просканировано 17 образцов, два из которых было исключено ввиду неадекватного качества данных. Реконструкция данных производилась с использованием программного пакета DSI Studio с использованием generalized q-sampling imaging.

Обработка данных гистологического исследования с окраской по Ван-Гизону производилась в программе QuPath с использованием встроенного модуля разделения окрасок на основе нейронной сети. В выбранной области (поперечник спинного мозга в области травмы) оценивался процент окраски по Ван-Гизону. Данные получались с каждого образца путём усреднения значений, измеренных с нескольких соседних срезов.

Полученные данные МР-трактографии: фракционная анизотропия, количественная анизотропия, радиальная диффузия в области травмы и всём образце, а также количество реконструируемых трактов коррелировали со средним значением процента окраски по Ван-Гизону. Для этого использовался программный пакет IBM SPSS и критерий корреляции Пирсона. Статистически достоверная корреляция ($p < 0,01$) была найдена только между процентом окраски по Ван-Гизону и количеством реконструируемых трактов во всём объёме образца. Далее производилась оценка полученной зависимости с построением модели линейной регрессии. Полученная модель зависимости процента окраски по Ван-Гизону от количеством реконструируемых трактов обладала обратной зависимостью, статистически достоверна ($p < 0,01$), с коэффициентом корреляции $R = 0,684$ и коэффициентом детерминации $R^2 = 0,468$.

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что процент окраски по Ван-Гизону в области травмы обратно зависит от количества реконструируемых трактов. Окраска по Ван-Гизону в свою очередь коррелирует с плотностью соединительной ткани, следовательно, данные трактографии, а именно количество реконструируемых трактов имеют обратную зависимость с плотностью соединительной ткани в области рубца. В то же время, согласно полученному коэффициенту детерминации, до 47% дисперсии в плотности соединительной ткани возможно было объяснить количеством реконструируемых трактов по данным МР-трактографии.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

Гузенко В.В.

Влияние точечного ацетилирования E2F1 по лизину 117 или 125 на апоптоз нейронов после ишемического повреждения

Южный федеральный университет, лаборатория «Молекулярная нейробиология», Ростов-на-Дону, Россия

✉ vguzenko@sfedu.ru

Аннотация. По результатам исследования уровень E2F1 увеличивается в цитоплазматической фракции через 4 и 24 часа после ишемического повреждения нейронов. Взаимодействие E2F1 с белком ретинобластомы (pRB) может подавлять активность самого E2F1 и теряют свою нативную конформацию.

Ключевые слова: E2F1; ацетилирование; апоптоз; пенумбра; фототромботический инсульт; окислительный стресс.

Guzenko V.V.

Effect of E2F1 spot acetylation at lysine 117 or 125 on neuronal apoptosis after ischemic injury

Southern Federal University, Laboratory of Molecular Neurobiology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. According to the results of the study, the level of E2F1 increases in the cytoplasmic fraction at 4 and 24 hours after ischemic neuronal injury. The interaction of E2F1 with retinoblastoma protein (pRB) can suppress E2F1 activity and lose its native conformation.

Keywords: E2F1; acetylation; apoptosis; penumbra; photothrombotic stroke; oxidative stress.

Инсульт является одной из основных причин смерти и инвалидности во всем мире. Исследуя молекулярные механизмы смерти клеток головного мозга после ишемического инсульта, позволят понять, как предотвратить повреждение нейронов вокруг очага ишемии, другими словами, пенумбры. Ряд научных обзоров указывают, что стремительная гибель нейронов в ядре инфаркта осуществляется путем некроза, а в пенумбре путем апоптоза [1]. А также существует взаимосвязь между сигнальными путями, которые регулируют клеточный цикл, и теми, которые способствуют апоптотической гибели клеток мозга [2]. Фактор транскрипции E2F1 идентифицирован как один из ключевых сигнальных белков, участвующий в запрограммированной гибели нейронов. Известно, что взаимодействие E2F1 с белком ретинобластомы (pRB) переключает функции белка из активатора транскрипции в репрессор, тем самым контролируя активность E2F1 [3]. Активность E2F1 также регулируется путем ацетилирования. Ацетилирование E2F1 несколькими ацетилтрансферазами, включая PCAF, p300/CBP и Tip60 [4] стабилизируют белок, увеличивая его время жизни. Однако, исследований того, как влияет ацетилирование E2F1 на его функции в нервных клетках или животных моделях повреждений мозга, очень мало. В связи с этим, целью работы явилось изучение влияния E2F1 и его ацетилированных по лизину 117 (E2F1AcK117) или по лизину 125 (E2F1AcK125) форм на апоптоз нейронов в ранний период после повреждения. Эксперименты проводились на животной модели фототромботического инсульта (ФТИ), основанные на генерации окислительного стресса.

По результатам вестерн-блот анализа показан статистически значимый рост уровня E2F1 в цитоплазматической фракции ткани пенумбры через 4 часа после фототромботического воздействия, но не в ядерной фракции, что согласуется с данными иммунофлуоресцентной микроскопии (ИФМ). Через 24 часа сверхэкспрессия белка как в цитоплазматической, так и в ядерной фракциях становилась более выраженной. Рост уровня E2F1 через 4 и 24 часа в перифокальной области ФТИ происходит за счет увеличения его экспрессии как в нейронах, так и в активированных астроцитах, но не клетках микроглии. На 7 сутки после

ФТИ уровень белка был низок и соответствовал контрольным значениям. В открытой базе данных UniProt (<http://www.uniprot.org/>) и программе GPS-PAIL 2.0 (<http://pail.biocuckoo.org/online.php>) был проведен поиск известных ацетилтрансфераз и деацетилаз, способных ацетилировать/деацетилировать E2F1. E2F1 может ацетилироваться PCAF и p300 по лизинам K117 и 125. Изменение уровня ацетилирования E2F1 по лизинам 117 (E2F1AcK117) и 125 (E2F1AcK125) после ФТИ значительно не изменялось. Исследования белок-белкового взаимодействия, свидетельствуют о том, что через 24 часа после ФТИ ацетилирование E2F1 осуществляет в основном PCAF, но не ацетилтрансферазой p300. Исследование активности гистондеацетилаз показывает, что HDAC1 деацетилирует преимущественно E2F1AcK125, поскольку активность HDAC1 увеличивалась более, чем в 2 раза в иммунопреципитате E2F1AcK125 ядерной фракции ткани перифокальной области через 24 часа после ФТИ. Вероятно, деацетилирование E2F1AcK117 осуществляют деацетилазы другого типа. Также было исследовано взаимодействие E2F1 и его ацетилированных форм с pRB через 24 часа после ФТИ. Анализ лигирования в основном наблюдается либо вблизи ядра клеток, либо в самом ядре, реже в цитоплазме. Количество взаимодействий E2F1AcK117 с pRB значительно меньше, чем у контрольных животных, однако количество взаимодействий E2F1 и E2F1AcK125 с pRB увеличивается на 50 и 80% соответственно. Чтобы понять, как ацетилирование E2F1 по лизину 117 или 125 влияет на связывание белка с его репрессором pRB, была проведена молекулярно-динамическая симуляция (МДС) с учетом условий окружающей среды, характерных для ишемии. При моделировании комплекса с ионами Ca^{2+} разрываются ионные связи третичной структуры белков E2F1 и pRB. А также конформация белков со временем меняется быстрее чем в присутствии ионов K^+ . Моделируя комплекс E2F1AcK125 с pRB удалось обнаружить межмолекулярное взаимодействие. В условиях ацетилирования в положении 117 и/или присутствии ионов Ca^{2+} в среде, приводят к частичной денатурации E2F1. Белок pRB также дестабилизируется, но в меньшей степени. При повышенных уровнях Ca^{2+} все типы комплексов теряют свою нативную конформацию. Изучив влияние точечного ацетилирования E2F1 по лизину 117 или 125 на апоптоз клеток перифокальной области после ФТИ не удалось обнаружить статистически значимые различия в количестве TUNEL-позитивных клеток, экспрессирующих E2F1AcK117 или E2F1AcK125. Однако двойное окрашивание клеток на активную каспазу-3 и E2F1AcK117 или E2F1AcK125, показало увеличение нейронов иммунопозитивных по E2F1AcK117 и активной каспазе-3. Подводя итоги, исследования влияния точечного ацетилирования E2F1 указывают, что белок может быть потенциальной терапевтической мишенью на ранней стадии после ишемического повреждения нейронов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ № FENW-2023-0018.

Список литературы

1. Uzdensky A. Apoptosis regulation in the penumbra after ischemic stroke: expression of pro and antiapoptotic proteins // *Apoptosis*. 2019. doi: 10.1007/s10495-019-01556-6
2. Becker E.B., Bonni A. Cell cycle regulation of neuronal apoptosis in development and disease // *Prog Neurobiol*. 2004. Vol. 72, N 1. P. 1–25. doi: 10.1016/j.pneurobio.2003.12.005
3. Sidle A., Palaty C., Dirks P., et al. Activity of the retinoblastoma family proteins, pRB, p107, and p130, during cellular proliferation and differentiation // *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1996. Vol. 31, N 3. P. 237–271. doi: 10.3109/10409239609106585
4. Martínez-Balbás M.A., Bauer U.M., Nielsen S.J., et al. Regulation of E2F1 activity by acetylation // *EMBO J*. 2000. Vol. 19, N 4. P. 662–671. doi: 10.1093/emboj/19.4.662

Гунбин К.В.^{1,2}, Копейна Г.С.^{3,4}, Животовский Б.Д.^{3–5}, Замараев А.В.^{3,4} ✉

Исследование белков CD1 у грызунов: эволюционные изменения и их влияние на иммунную систему

¹ Центр митохондриальной функциональной геномики, Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

⁴ Факультет фундаментальной медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ a-zamaraev@ya.ru

Аннотация. Биоинформатический анализ белков кластера дифференциации 1 (CD1) в геномах грызунов показал, что голый землекоп, как уникальный представитель подотряда дикобразных, утратил ряд белков (CD1b, CD1d, CD1e), что тесно связано с отсутствием NKT-клеток и особенностями его иммунной системы.

Ключевые слова: кластер дифференциации 1; голый землекоп; иммунная система; NKT клетки.

Gunbin K.V.^{1,2}, Kopeina G.S.^{3,4}, Zhivotovsky B.D.^{3–5}, Zamaraev A.V.^{3,4}

Study of CD1 proteins in rodents: evolutionary changes and their impact on the immune system

¹ Center for Mitochondrial Functional Genomics, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

² Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow Russia

⁴ Faculty of Medicine, MV Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 210, Stockholm, Sweden

Abstract. Bioinformatics analysis of cluster of differentiation 1 (CD1) proteins in rodent genomes showed that the naked mole-rat, as a unique representative of the porcupine suborder, has lost a number of proteins (CD1b, CD1d, CD1e) that are closely related to the absence of NKT cells and the characteristics of his immune system.

Keywords: cluster of differentiation 1; naked mole rat; immune system; NKT cells.

Клеточная адаптивная иммунная система во многом зависит от антигенпрезентирующих молекул на поверхности клеток и их взаимодействия с Т-клетками. Некоторые Т-клетки могут распознавать не только пептидные антигены, но и непептидные, представленные МНС-подобными молекулами, а именно кластером дифференцировки 1 или CD1. Члены семейства CD1 презентуют собственные и чужеродные липидные антигены специфическим CD1-направленным Т-лимфоцитам. В настоящее время хорошо известны пять членов семейства CD1, которые на основе гомологии последовательностей разделены на три группы: группа I (CD1a, CD1b и CD1c), группа II (CD1d) и группа III (CD1e). Белки группы I преимущественно экспрессируются на антигенпредставляющих клетках, представляя разнообразные собственные и патогенные липидные антигены. В отличие от группы I, CD1d широко экспрессируется на различных кроветворных и некроветворных клетках, включая эпителиальные клетки. Различные гликолипиды, фосфолипиды или липопептиды могут быть представлены молекулами CD1d естественным Т-киллерам (NKT) клеткам, которые играют как иммуноактивирующую, так и иммуносупрессивную роль. Третья группа членов семейства CD1 представлена внутриклеточным белком CD1e, который локализуется преимущественно в аппарате Гольджи, где облегчают презентацию эндогенных и экзогенных липидных антигенов белками CD1. Однако, число генов CD1 и состав

локусов CD1 широко варьируются среди различных видов млекопитающих. Проведенный нами компьютерный анализ отряда грызунов подтвердил высокое эволюционное разнообразие в семействе белков CD1. Анализ последовательности генома и реконструкция белков CD1 показали, что подотряд Дикобразообразных (морская свинка, голый землекоп и др.) и Белообразных (белка, сурок и др.) представляют собой наиболее консервативную группу грызунов, содержащую почти все типы генов CD1. Подотряд Мышеобразные — наиболее дивергентная и эволюционно новая группа грызунов. Несмотря на высокую консервативность подотряда Дикобразообразных, было выявлено, что голый землекоп является уникальным животным, содержащим функциональные гены только CD1c и CD1a, в отличие от соседнего представителя — Дамарский пескорой и других видов в подотряде Дикобразообразных. Среди всех грызунов лишь у нескольких видов, таких как голый землекоп и египетский тушканчик, ген CD1d отсутствует. Недавние детальные исследования голого землекопа выявили уникальные особенности его иммунной системы, которые характеризуются отсутствием канонических естественных клеток-киллеров (NK) и естественных Т-клеток киллеров (NKT) [1]. Учитывая незаменимую роль CD1d в развитии NKT-клеток [2], по-видимому, в ходе эволюции ось CD1d/NKT была утрачена в иммунной системе голого землекопа, возможно, из-за его атипичного поведения среди млекопитающих. Важно отметить, что эксперименты с мышами, нокаутными по CD1d, демонстрируют незаменимость данного белка для развития NKT-клеток и противовирусного ответа [2]. В ответ на герпесвирусную инфекцию у этих нокаутных мышей наблюдалось значительно сниженная способность противостоять вирусной нагрузке. Более того, было показано, что вирус простого герпеса 1 специфически ингибирует CD1d-опосредуемую презентацию антигена путем подавления рециркуляции CD1d на поверхности клетки и активации NKT-клеток, тем самым усиливая вирусную патогенность. Стоит отметить, что эксперименты с векторами герпесвирусов привели к летальному исходу у всех голых землекопов в исследовании [3]. По-видимому, высокая восприимчивость голых землекопов к вирусам, особенно к герпесвирусу, может быть частично связана с потерей CD1d/NKT взаимодействия. Сравнительное исследование иммунитета голых землекопов и мышей выявило еще одну интересную особенность механизмов врожденной иммунной защиты. Доля макрофагов селезенки, их фагоцитарная способность и продукция цитокинов были значительно выше у голого землекопа, чем в селезенке мыши. Более того большинство макрофагов голого землекопа в наивном состоянии экспрессируют NK1.1, поверхностный антиген, обычно присутствующий на NK-клетках и NKT-клетках у мышей [4]. Кроме того, недавние исследования показали, что у голого землекопа имеется большая популяция гамма-дельта-Т-клеток с NK-подобным цитотоксическим эффекторным фенотипом [5]. Таким образом, можно предположить, что иммунная система голого землекопа могла частично компенсировать потерю NKT и NK-клеток за счет стимуляции миелоидных клеток и высокой распространенностью NK-подобных гамма-дельта-Т-клеток, которые успешно справляются с уничтожением стареющих или поврежденных клеток, продлевая продолжительность жизни голого землекопа.

Список литературы

1. Hilton H.G., Rubinstein N.D., Janki P., et al. Single-cell transcriptomics of the naked mole-rat reveals unexpected features of mammalian immunity // bioRxiv. 2019. ID 597195. doi: 10.1101/597195
2. Exley M.A., Bigley N.J., Cheng O., et al. Innate immune response to encephalomyocarditis virus infection mediated by CD1d // Immunology. 2003. Vol. 110, N 4. P. 519–526. doi: 10.1111/j.1365-2567.2003.01779.x
3. Artwohl J., Ball-Kell S., Valyi-Nagy T., et al. Extreme susceptibility of african naked mole rats (*Heterocephalus glaber*) to experimental infection with herpes simplex virus type 1 // Comp Med. 2009. Vol. 59, N 1. P. 83–90.
4. Wada H., Shibata Y., Abe Y., et al. Flow cytometric identification and cell-line establishment of macrophages in naked mole-rats // Sci Rep. 2019. Vol. 9. ID 17981. doi: 10.1038/s41598-019-54442-1
5. Sanchez Sanchez G., Emmrich S., Georga M., et al. Invariant $\gamma\delta$ TCR natural killer-like effector T cells in the naked mole-rat // Nat Commun. 2024. Vol. 15. ID 4248. doi: 10.1038/s41467-024-48652-z

Гурбо В.Э.¹ ✉, Антоневиц Н.Г.¹, Гончаров А.Е.¹, Докукина Т.В.², Голубева Т.С.²

Оценка дифференцировочного потенциала моноцитов в микроглиальном направлении у пациентов с шизофренией в сравнении со здоровыми добровольцами

¹ Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Республика Беларусь

² Республиканский научно-практический центр психического здоровья, Минск, Республика Беларусь

✉ veronikamantivoda@gmail.com

Аннотация. *In vitro* модельная тест-система микроглиеподобных клеток, полученных из моноцитов человека является новым и перспективным методом изучения микроглии. В данной работе проведена сравнительная характеристика дифференцировки моноцитов в микроглию в группе здоровых добровольцев и пациентов с шизофренией.

Ключевые слова: моноциты; микроглиальные клетки; дифференцировка; шизофрения.

Hurbo V.E.¹, Antonevich N.G.¹, Goncharov A.Y.¹, Dokukina T.V.², Golubeva T.S.²

Assessment of the differentiation potential of monocytes in the microglial direction in patients with schizophrenia compared to healthy volunteers

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² State Institution «Republican Scientific and Practical Center for Mental Health», Minsk, Belarus

Abstract. *In vitro* model test-system of microglia-like cells derived from human monocytes is a new and promising method for studying microglia. This work provides a comparative description of the differentiation of monocytes into microglia in a group of healthy volunteers and patients with schizophrenia.

Keywords: monocytes; microglial cells; differentiation; schizophrenia.

Микроглиальные клетки играют ключевую роль в поддержании гомеостаза центральной нервной системы (ЦНС). Нарушение в работе микроглии является ключевым фактором развития нейровоспаления при нейродегенеративных заболеваниях и психических расстройствах [1]. Ряд исследований подтверждает, что моноциты периферической крови способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, целостность которого нарушается при нейровоспалении [2]. В этой связи разработка *in vitro* модельной тест-системы микроглиеподобных клеток, полученных из моноцитов человека, является новым инструментом для изучения механизмов активации микроглии при различных заболеваниях [3]. Целью данного исследования явилась оценка дифференцировочного потенциала моноцитов крови в микроглиальном направлении у пациентов с шизофренией в сравнении со здоровыми добровольцами. В исследование было включено 42 пациента с шизофренией (диагнозы по МКБ-10: F20.0 — параноидная шизофрения ($n = 25$), F20.01 — шизофрения с эпизодическим течением ($n = 14$), F20.09 — шизофрения неуточненная ($n = 3$)) и 45 здоровых добровольцев. С информированного согласия осуществляли взятие 20 мл периферической крови в пробирки с гепарином натрия. Иммунофенотип моноцитов оценивали методом проточной цитометрии на приборе Attune NxT (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием моноклональных антител к антигенам CD14 (Elabscience, Китай), P2RY12 (Biolegend, США), HLA-DR (Invitrogen, США), CD80 (BioLegend, США), конъюгированных с флуорохромами, определяли относительное содержание клеток (%) и среднюю интенсивность флуоресценции маркеров (MFI). Дифференцировочный потенциал моноцитов оценивали у пациентов с подтверждённым

диагнозом F20.0 (код по МКБ-10) ($n = 10$) и здоровых добровольцев ($n = 10$). Общую фракцию мононуклеаров периферической крови вносили в 12-луночные планшеты с повышенными адгезивными свойствами Cell⁺ в бессывороточной питательной среде RPMI-1640 с таким расчетом, чтобы концентрация CD14⁺-моноцитов составила 4×10^5 клеток/см². После адгезии моноцитов дифференцировку запускали согласно литературным данным [3] с использованием коктейля цитокинов GM-CSF (10 нг/мл) и IL-34 (100 нг/мл). Замена среды производилась каждые 2–3 дня на протяжении 14 суток. Морфологический контроль дифференцировки производили методом фазово-контрастного микроскопирования. Для обработки данных использовали непараметрические методы статистики. В результате иммунофенотипического анализа была выявлена повышенная экспрессия костимуляторной молекулы CD80 и маркера активации HLA-DR на моноцитах крови пациентов с шизофренией ($n = 42$) по сравнению с группой здоровых добровольцев ($n = 45$). В популяции CD14⁺-клеток в группе пациентов с шизофренией экспрессия CD80 составила 47,12 (33,80–54,30)%; HLA-DR — 3836,60 (2061,97–5751,64)MFI, что было в 2 раза выше, чем в группе здоровых добровольцев: CD80 — 25,8 (14,0–40,6)%; HLA-DR — 1345,9 (947,8–2021,3)MFI ($p \leq 0,001$; $p \leq 0,001$). На следующем этапе исследования оценивали адгезивную способность моноцитов. В лунках с образцами здоровых добровольцев число прикрепленных моноцитов составило $1,7 \times 10^5$ ($1,5 \times 10^5$ – $2,4 \times 10^5$) клеток/см². В то же время в лунках с образцами пациентов с шизофренией число прикрепленных моноцитов составило $1,1 \times 10^5$ ($0,9 \times 10^5$ – $1,2 \times 10^5$) клеток/см² ($p = 0,01$). На 10–14 сутки производили морфологический анализ культур. Клеточные культуры, полученные из моноцитов пациентов с шизофренией, не имели отростков и приобретали амебоидную морфологию, характерную для активированной микроглии и макрофагов, при этом более 70% клеток откреплялось от пластика к окончанию культивирования. В то же время клетки в культурах здоровых добровольцев приобретали разветвленную морфологию с многочисленными отростками и оставались прикрепленными к культуральному пластику на протяжении всех сроков наблюдения. Для подтверждения запуска процесса дифференцировки полученные микроглиеподобные культуры от здоровых добровольцев исследовали на наличие экспрессии молекулы миелоидного ряда CD14 и специфичного микроглиального маркера P2RY12. Экспрессия P2RY12⁺ составила — 10,88(8,63–53,96)%, а экспрессия CD14 — 23,81(10,82–96,13)%. Таким образом, согласно полученным результатам, моноциты пациентов с шизофренией характеризуются провоспалительным иммунофенотипом (усиление экспрессии молекул активации HLA-DR и CD80), сниженной адгезивной способностью к культуральному пластику, что в совокупности может влиять на способность к дифференцировке и ограничивать возможность получения достаточного количества микроглиеподобных клеток. При этом из моноцитов здоровых добровольцев удается получить культуру микроглиеподобных клеток, которая характеризуется типичным для микроглии головного мозга иммунофенотипом и морфологией. Данная может быть использована в качестве тест-системы для дальнейших исследований их иммунофункциональных свойств.

Список литературы

1. Leng F., Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? // *Nat Rev Neurol*. 2021. Vol. 17. P. 157–172. doi: 10.1038/s41582-020-00435-y
2. Mayer M.G., Fischer T. Microglia at the blood brain barrier in health and disease // *Front Cell Neurosci*. 2024. Vol. 18. ID 1360195. doi: 10.3389/fncel.2024.1360195
3. Ohgidani M., Kato T.A., Setoyama D., et al. Direct induction of ramified microglia-like cells from human monocytes: dynamic microglial dysfunction in Nasu – Hakola disease // *Sci Rep*. 2014. Vol. 4. ID 4957. doi: 10.1038/srep04957

Гуреенков А.Д.¹ ✉, Цоколаева З.И.^{1,2}, Белоглазова И.Б.¹, Парфёнова Е.В.^{1,3}, Дергилёв К.В.¹

Участие аутофагии в формировании миофибробластов и развитии фиброза сердца *in vivo*

¹ ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитации», Москва, Россия

³ ФГБУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

✉ alexandre.gureenkov@yandex.ru

Аннотация. Аутофагия активируется во время TGF- β 1-индуцированного перехода фибробластов в миофибробласты *in vitro* и при моделировании фиброза сердца *in vivo*. Нокдаун ATG7 препятствует образованию миофибробластов, что выделяет аутофагию как перспективную мишень при лечении фиброза сердца.

Ключевые слова: аутофагия; фибробласты; миофибробласты; фиброз сердца.

Gureenkov A.D.¹, Tsokolaeva Z.I.^{1,2}, Beloglazova I.B.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,3}, Dergilev K.V.¹

The involvement of autophagy in the formation of myofibroblasts and the development of cardiac fibrosis *in vivo*

¹ Institute of Experimental Cardiology Named after Academician V.N. Smirnov, Federal State Budgetary Institution National Medical Research Center of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov, Ministry of Health of the Russian Federation, 121552 Moscow, Russia

² Federal Research and Clinical Center of Intensive Care Medicine and Rehabilitology, Moscow, Russia

³ Laboratory of postgenomic technologies in medicine, Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Autophagy is upregulated during TGF- β 1-induced fibroblast-to-myofibroblast transition and the development of cardiac fibrosis *in vivo*. ATG7 knockdown reduces myofibroblast traits, suggesting that autophagy modulation could be a promising antifibrotic strategy.

Keywords: autophagy; fibroblasts; myofibroblasts; cardiac fibrosis.

Фибробласты сердца (ФБ) являются основным типом клеток, ответственных за образование и деградацию внеклеточного матрикса (ВКМ). Он необходим для обеспечения сократительной функции сердца, организации сосудистой сети, а также задействован в регуляции различных физиологических и патологических сигнальных процессов. Под действием различных стимулов ФБ активируются и могут дифференцироваться в миофибробласты (МФБ). Неконтролируемая активация ФБ, накопление МФБ ведут к нарушению баланса между синтезом и деградацией белков ВКМ, что в конечном счёте ведёт к развитию фиброза сердца. На сегодняшний день не существует эффективных методов лечения и плохо изучены молекулярные механизмы-регуляторы этого процесса, поэтому изучение механизмов профиброзной трансформации клеток является необходимым для выявления новых терапевтических мишеней. Последние исследования отмечают участие аутофагии при дифференцировке ФБ в МФБ. В норме аутофагия находится в сердце на базальном уровне, что необходимо для поддержания клеточного гомеостаза. Было обнаружено, что культивирование ФБ крыс на культуральном пластике индуцирует фенотип МФБ, сопровождающийся усилением аутофагии [1]. Также было отмечено, что ингибирование аутофагии, например, при помощи релаксина препятствует развитию фиброза сердца [2]. Однако другие исследования утверждают, что при инфаркте миокарда активация аутофагии способствует ослаблению фиброза [3]. Таким образом, точные механизмы формирования МФБ остаются малоизученными, а конкретная роль аутофагии в этом процессе неясна.

Цель данной работы — изучение участия аутофагии при TGF- β 1-индуцированном переходе ФБ в МФБ и развитии фиброза сердца *in vivo*.

Первичную культуру ФБ мыши получали ферментативным расщеплением ткани (раствор 420 мкг/мл коллагеназы 4 и диспазы 2) с последующей селекцией ФБ преплейтингом в течение 2 часов. В качестве профиброзного индуктора использовали рекомбинантный TGF- β 1 (5 нг/мл, обработка в течение 48 часов; Reprotech). Оценка трансформации ФБ в направлении МФБ проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии, проточной цитофлуориметрии (BD FACSAria III), иммуноцитохимии, иммуноблоттинга. Для детекции маркеров аутофагии использовали иммуноблоттинг; визуализацию аутофагосом проводили с помощью красителей (Autophagy Assay Kit (Sigma)) и голотомографии (Tomocube HT-X1). При помощи siRNA проводили нокдаун гена ATG7. Для индукции развития фиброза сердца *in vivo* использовали модель поперечного сужения аорты (ТАС — Transverse Aortic Constriction) у самцов мышей. Оценка показателей систолической и диастолической функции сердца проводили с помощью эхокардиографии (VisualSonics Vevo 1100). На 150-й день после операции проводили извлечение сердец и фиксировали накопление коллагенов в ткани путём окрашивания пикросириусом красным с последующей оценкой с помощью NIS.ai Imaging Software; уровень аутофагии в лизатах ткани сердца исследовали иммуноблоттингом.

Клетки в составе первичной культуры ФБ имели веретенообразную форму, экспрессировали характерные маркеры (FSP1, CD90, uPAR) и сохраняли способность к пролиферации *in vitro*. Мы показали, что обработка TGF- β 1 ведёт к изменению их морфологии: происходит увеличение размеров клеток и формирование множественных стресс-фибрилл, в состав которых включался гладкомышечный α -актин (α -SMA), что указывает на приобретение клетками сократительного фенотипа. Переход в МФБ сопровождался накоплением аутофагосом (40 ± 22 шт/клетку (контроль) и 112 ± 24 шт/клетку (обработка TGF- β 1), $p = 5,6 \cdot 10^{-6}$) и 2-кратным повышением содержания LC3 II, что указывает на повышение активности аутофагии. После нокдауна гена ATG7 клетки теряли характерные для МФБ черты: содержание коллагена I и α -SMA в культуре снизилось практически в 2 раза, а индукция TGF- β 1 не привела к значимому повышению экспрессии белков МФБ.

Эти данные согласуются с изменениями в сердце, происходящими при моделировании развития фиброза *in vivo* путём поперечного сужения аорты (ТАС). Через 150 дней после ТАС у экспериментальных животных наблюдалось значительное увеличение размеров сердца за счёт гипертрофии и дилатации в сравнении с ложно оперированными животными (sham). Окрашивание криосрезов сердец пикросириусом красным обнаружило, что экспериментальные животные имели выраженный интерстициальный и периваскулярный фиброз, о чём свидетельствует восьмикратное повышение уровня коллагенов в сердце ($1,55 \pm 0,15\%$ (sham) и $12,53 \pm 2,96\%$ (ТАС), $p = 0,0046$). Анализ лизатов ткани продемонстрировал рост соотношения LC3 II/LC3 I в 2,5 раза у экспериментальных животных по сравнению с ложно оперированными ($p = 0,0079$), что служит признаком активации аутофагии.

Таким образом, переход ФБ в МФБ *in vitro* и развитие фиброза сердца *in vivo* сопровождается повышением уровня аутофагии; при этом подавление экспрессии ATG7 препятствует образованию МФБ. Следовательно, модуляция уровня аутофагии может служить перспективным подходом для воздействия на (мио)фибробласты и коррекции фиброза сердца.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-15-00540.

Список литературы

1. Gupta S.S., Zeglinski M.R., Rattan S.G., et al. Inhibition of autophagy inhibits the conversion of cardiac fibroblasts to cardiac myofibroblasts // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, N 48. P. 78516–78531. doi: 10.18632/oncotarget.12392
2. Yuan Y., Zhang Y., Han X., et al. Relaxin alleviates TGF β 1-induced cardiac fibrosis via inhibition of Stat3-dependent autophagy // *Biochem Biophys Res Commun*. 2017. Vol. 493, N 4. P. 1601–1607. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.09.110
3. Araki S., Izumiya Y., Rokutanda T., et al. Sirt7 contributes to myocardial tissue repair by maintaining transforming growth factor- β signaling pathway // *Circulation*. 2015. Vol. 132, N 12. P. 1081–1093. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014821

Гурьев Н.А. ✉, Иванова Ю.С., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.

Активность антиоксидантной системы индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека и их дифференцированных потомков в условиях окислительного стресса

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ guriev.nik.and@gmail.com

Аннотация. H_2O_2 -опосредованный сигналинг отвечает за широкий спектр эффектов в клетках. Существует гипотеза о специфическом метаболизме H_2O_2 в плюрипотентных клетках, относительно более дифференцированных клеток, учитывая их нишу *in vivo*. Однако данные, подтверждающие эту гипотезу, противоречивы.

Ключевые слова: плюрипотентные стволовые клетки; окислительный стресс; антиоксидантная система; биосенсор HyPer; активные формы кислорода.

Guriev N.A., Ivanova J.S., Pugovkina N.A., Lyublinskaya O.G.

Activity of the antioxidant system of induced human pluripotent stem cells and their differentiated progeny under conditions of oxidative stress

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. H_2O_2 -mediated signalling is responsible for a wide range of effects in cells. A hypothesis has been proposed regarding the specific metabolism of H_2O_2 in pluripotent cells relative to more differentiated cells, given their niche *in vivo*. However, the evidence in support of this hypothesis is inconclusive.

Keywords: pluripotent stem cells; oxidative stress; antioxidant system; biosensor HyPer; reactive oxygen species.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) широко используются в регенеративной медицине и при моделировании различных заболеваний. Сигнальная система, опосредованная H_2O_2 , одним из основных представителей активных форм кислорода (АФК), активно участвует в определении судьбы плюрипотентных стволовых клеток, посредством изменения окислительно-восстановительного баланса, называемого «окислительным стрессом», и может оказывать широкий спектр эффектов в клетках — от индукции апоптоза до инициирования различных программ дифференцировки [1]. При этом, до сих пор было мало известно о редокс-метаболизме в плюрипотентных клетках, а также существовали противоречивые данные о специфическом редокс-статусе плюрипотентных клеток в сравнении с более дифференцированными клетками.

В данном исследовании, используя генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer для количественной оценки антиоксидантной активности в живых клетках [2], мы сравнили ответ на окислительный стресс, опосредованный H_2O_2 , в ИПСК человека и их дифференцированных потомках. ИПСК человека были получены из мезенхимных стволовых клеток человека, экспрессирующих генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer в цитоплазме, а дифференцированные потомки были получены путем спонтанной дифференцировки ИПСК. Применяя проточно-цитометрическую методику на основе биосенсора HyPer, ранее разработанную в нашей лаборатории [3], мы показали, что при внешнем окислительном стрессе ИПСК и их дифференцированные потомки демонстрируют схожую антиоксидантную активность.

Более того, используя ингибиторный анализ, включающий химическое ингибирование основных участников ферментативных путей (ауранофин для тиоредоксин-зависимого и L-бутионин сульфоксимин для глутатион-зависимого путей), обеспечивающих антиоксидантную защиту клеток, мы продемонстрировали, что в обеих клеточных линиях тиоредоксин-зависимый путь вносит значительный вклад в общую антиоксидантную активность при низких окислительных нагрузках. В то же время, при интенсивном окислительном стрессе глутатион-зависимая антиоксидантная система берет на себя основную роль в устранении перекиси в клетках. Таким образом, наши наблюдения указывают на сходство в метаболизме перекиси водорода у плюрипотентных и дифференцированных клеток.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 21-74-20178.

Список литературы

1. Kaitsuka T., Hakim F. Response of pluripotent stem cells to environmental stress and its application for directed differentiation // *Biology (Basel)*. 2021. Vol. 10, N 2. ID 84. doi: 10.3390/biology10020084
2. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat Methods*. 2006. Vol. 3. P. 281–286. doi: 10.1038/nmeth866
3. Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., et al. Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes // *Redox Biol*. 2022. Vol. 50. ID 102245. doi: 10.1016/j.redox.2022.102245

Давиденко А.В.^{1,2} ✉, Климина К.М.¹, Султанов Р.И.¹, Шендер В.О.¹, Арапиди Г.П.¹, Богомазова А.Н.^{1,3}, Лагарькова М.А.¹

Иммунный фенотип астроцитов, полученных из ИПСК пациентов со спиноцереbellарной атаксией 17-го типа

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

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

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

✉ davidenko.av@mail.ru

Аннотация. Астроциты, дифференцированные из ИПСК пациентов со SCA17, обладают провоспалительным фенотипом. Астроциты из ИПСК здорового носителя мутации демонстрируют тот же фенотип, но менее выражено.

Ключевые слова: спиноцереbellарная атаксия; ИПСК; астроцит; нейровоспаление; TNF.

Davidenko A.V.^{1,2}, Klimina K.M.¹, Sultanov R.I.¹, Shender V.O.¹, Arapidi G.P.¹, Bogomazova A.N.^{1,3}, Lagarkova M.A.¹

Immune phenotype of astrocytes from spinocerebellar ataxia type 17 patient-derived iPSC

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. iPSC-derived astrocytes from patients with SCA17 have proinflammatory phenotype. Astrocytes from a healthy mutation carrier show the same phenotype but to a lesser extent.

Keywords: spinocerebellar ataxia; iPSC; astrocyte; neuroinflammation; TNF.

Спиноцереbellарная атаксия 17-го типа (SCA17) — это наследственное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся поражением значительной части головного мозга, тяжёлыми симптомами и необратимым прогрессированием. Причиной SCA17 является мутация экспансии тринуклеотидных CAG-повторов в кодирующей части гена TBP. Механизмы развития заболевания изучены плохо, но считается, что в патогенезе SCA17 задействовано несколько различных факторов, одним из которых предположительно является нейровоспаление. Характерным признаком воспалительного процесса в головном мозге является появление реактивных астроцитов, патологически изменённых клеток, отличающихся в том числе повышенной продукцией провоспалительных факторов. Целью данной работы было исследование иммунного фенотипа астроцитов, несущих мутацию экспансии тринуклеотидных CAG-повторов в гене TBP. В работе мы использовали полученные ранее ИПСК пациентов со SCA17, здорового носителя мутации и ИПСК здоровых доноров. ИПСК дифференцировали в астроглиальном направлении, полученные дифференцированные клетки характеризовали путём иммуноокрашивания на маркеры астроцитов S100b и GFAP. В астроглиальных клетках SCA17 мы наблюдали более высокий уровень экспрессии провоспалительного цитокина TNF. На обработку экзогенным TNF астроглиальные клетки SCA17 отвечают дополнительным повышением экспрессии гена TNF, однако это повышение менее выражено, чем в здоровом контроле. Астроциты SCA17 не демонстрируют повышенной чувствительности к низким концентрациям TNF, что свидетельствует в пользу того, что их активированное состояние не связано со способностью реагировать на более низкие пороговые стимулы. Транскриптомный анализ полученных клеток подтвердил, что в астроцитах с мутацией TBP

по сравнению с контролем наблюдается повышенная экспрессия ряда генов, относящихся к иммунному ответу (GO:0019221; GO:0034612), причём данный фенотип более выражен у клеток больных, чем у клеток здорового носителя мутации. Результат подтверждён анализом секретома клеток. Таким образом, мы показали, что астроциты SCA17 демонстрируют признаки иммунной активации, что говорит о том, что воспалительный процесс может быть одним из механизмов патогенеза SCA17.

Работа финансировалась из средств гранта Министерства науки и высшего образования № 075-15-2019-1669.

Даиоб К. ✉, Камалов М.И., Авдокушина С.М., Салахиева Д.С., Абдуллин Т.И., Зухайб М.

Характеристика пористого гидрогеля на основе олиго(полиэтиленгликольфумарата) в качестве матрикса для нейрорегенерации

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ kdaiob@stud.kpfu.ru

Аннотация. Синтетические гидрогели являются важной структурной основой для создания биоматериалов, предназначенных для регенерации поврежденных нервных тканей. Были получены и охарактеризованы пористые гидрогели из олиго(поли(этиленгликоль) фумарата) в качестве матрикса для нейрональных клеток.

Ключевые слова: синтетические гидрогели; полиэтиленгликоль; регенерация нервов; вязкоупругие свойства; нейрональные клетки.

Dayob K., Kamalov M.I., Avdokushina S.M., Salakhieva D.S., Abdullin T.I., Zoughaib M.

Characterization of a porous hydrogel based on oligo(poly(ethylene-glycol) fumarate) as a matrix for neuroregeneration

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Synthetic hydrogels are important constituents of biomaterials for regeneration of damaged nerves. In this study, porous hydrogels based on oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) were prepared and characterized as a matrix for neuronal cells.

Keywords: synthetic hydrogels; polyethylene glycol; nerve regeneration; viscoelastic properties; neuronal cells.

Травматические повреждения нервной системы (НС) относятся к распространенным и тяжелым видам травм, имеющих высокую степень инвалидизации. Их лечение представляет собой серьезную медицинскую и социально-экономическую проблему во всем мире. В её решении важной задачей является разработка имплантируемых биоматериалов, временно заполняющих дефекты тканей НС и способствующих регенерации НС [1]. Перспективной полимерной системой для создания биосовместимых и биodeградируемых скаффолдов являются производные полиэтиленгликоля (PEG), которые могут быть модифицированы для придания им требуемых физических и (био)химических свойств.

Нами разработан пористый гидрогель на основе предварительно синтезированного олиго(поли(этиленгликоль) фумарата) (OPF), сополимеризованного с PEG-диакрилатом и катионным мономером (2-метакрилоилоксиэтил)триметиламмония хлоридом (METAC). По данным лазерной сканирующей конфокальной микроскопии гидрогели содержали поры со средним размером 80 ± 13 мкм [2].

Исследованы набухающая способность и вязкоупругие свойства серии синтезированных гидрогелей в зависимости от состава. Показано, что гидрогели в широком диапазоне концентраций макромеров и мономеров преимущественно имеют хорошо организованную гидрогелевую структуру со значительным преобладанием модуля упругости (G') над модулем вязкости (G''). Установлены взаимосвязи между концентрацией компонентов гидрогеля и содержанием воды, параметров G' и G'' и G'/G'' , а также диапазоны вязкоупругих характеристик, соответствующих тканям центральной НС.

Оценено влияние METAC на поведение нейрональных клеток в гидрогелях. По данным теста на адгезию катионный мономер способствовал прикреплению клеток феохромоцитомы крысы (линия PC-12) и нейробластомы человека (линия SH-SY5Y) на гидрогелевой поверхности, их миграцию в матрикс, а также стимулировал пролиферацию клеток приблизительно в 2–4 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности пористой гидрогелевой системы на основе OPF в качестве матрикса для нейрональных клеток с регулируемыми физико-химическими свойствам.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

Список литературы

1. Zhang Q., Shi B., Ding J., et al. Polymer scaffolds facilitate spinal cord injury repair // *Acta Biomaterialia*. 2019. Vol. 88. P. 57–77. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.056
2. Zoughaib M., Dayob K., Avdokushina S., et al. Oligo (poly(ethyleneglycol) fumarate)-based multicomponent cryogels for neural tissue eplacement // *Gels*. 2023. Vol. 9, N 2. ID 105. doi: 10.3390/gels9020105

Дарвиш Д.М.^{1,2} ✉, Титова А.Р.¹, Александрова С.А.¹

Остеоиндуктивный биокompозит на основе фибриллярного коллагена и фиброина шелка: получение, характеристика, оценка остеоиндуктивности

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия

✉ darvishdi@mail.ru

Аннотация. Разработан остеоиндуктивный биокompозитный гель на основе фибриллярного коллагена и фиброина шелка. Продемонстрированы его высокие механические свойства, устойчивость к биodeградации, способность минерализоваться в физиологических условиях с образованием сфероидов гидроксиапатита, а также способность стимулировать клеточную пролиферацию.

Ключевые слова: остеоиндуктивный биокompозит; коллаген; коллагеновый гель; фиброин.

Darvish D.M.^{1,2}, Titova A.R.¹, Aleksandrova S.A.¹

Osteoinductive biocomposite based on fibrillar collagen and silk fibroin: preparation, characterization, assessment of osteoinductivity

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, Saint Petersburg, Russia

Abstract. An osteoinductive biocomposite gel based on fibrillar collagen and silk fibroin has been developed. Its high mechanical properties, resistance to biodegradation, the ability to mineralize under physiological conditions with the formation of hydroxyapatite spheroids, as well as the ability to stimulate cell proliferation have been demonstrated.

Keywords: osteoinductive biocomposite; collagen; collagen gel; fibroin.

Создание эффективных материалов, способствующих естественной регенерации труднозаживающих дефектов костной ткани продолжает быть актуальной задачей, несмотря на все достижения науки последних десятилетий. Регенерация костной ткани — это сложный физиологический процесс, который имеет свои особенности для разных групп пациентов. Поэтому и требования, предъявляемые к материалам, призванным поддержать этот процесс, весьма высоки. Биокompозиты способны сочетать в себе преимущества каждого из его компонентов, что позволяет создавать материалы с регулируемыми свойствами и является шагом на пути к персонализированной медицине. Коллаген является основным белком костной ткани, где он находится в фибриллярном состоянии и играет доминирующую роль в создании структурной целостности самой кости. Коллагеновые фибриллы легко получить в условиях *in vitro*, однако, полученные таким образом материалы обладают рядом недостатков: низкими механическими свойствами и высокой скоростью биodeградации. Фиброин, напротив, гораздо более устойчив к биodeградации, к тому же, на основании литературных данных известно, что он способен проявлять остеоиндуктивные свойства за счет осаждения фосфатов кальция на аморфных участках его молекулярных цепей. Целью настоящего исследования являлась разработка остеоиндуктивного биокompозитного геля на основе фибриллярного коллагена и фиброина шелка, обладающего повышенными механическими свойствами и устойчивостью к биodeградации.

Для формирования биокompозитных гелей предварительно инициировали процессы желирования в растворах: в коллагене — за счет добавления нейтрализующего солевого раствора, а в фиброине — путём

обработки раствора ультразвуком. После соответствующей обработки коллаген смешивали с фиброином, заливали в лунки 24-луночного планшета и термостатировали 1 сутки при $T = 30^{\circ}\text{C}$. Содержание фиброина в биокомпозитах варьировалось и составляло 5, 10 и 20%. У полученных гелей были проанализированы механические свойства, устойчивость к биодеградации, способность к минерализации в физиологических условиях, а также биосовместимость при взаимодействии с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (МСК) костного мозга кролика.

В результате проведенных исследований было показано, что устойчивость к сжимающим нагрузкам биокомпозитных гелей превосходила тот же показатель у коллагенового геля в 4–5 раз, даже при малом объемном содержании фиброина. Также кратно увеличивалась и устойчивость к биодеградации. В условиях, имитирующих физиологические, спустя месяц биокомпозитные гели с содержанием фиброина 20% практически не изменили своих исходных размеров, в то время как коллагеновые гели полностью деградировали. Минерализация образцов в моделируемой физиологической жидкости позволила выявить образование большого количества сфероидов гидроксиапатина на образцах, содержащих 20% фиброина шелка, что является основанием предполагать остеоиндуктивные свойства данного материала.

Оценка биосовместимости (методом МТТ-теста) продемонстрировала отсутствие цитотоксического действия образцов на МСК. При этом была выявлена способность клеток адгезировать к биокомпозитам и пролиферировать. Было установлено увеличение количества клеток на всех образцах в процессе культивирования в течение 28 сут. Пиковые значения наблюдались на образцах, содержащих 10% фиброина, где количество клеток вдвое превосходило контроль (коллагеновый гель). Способность биокомпозитов к остеоиндукции проводилась путем культивирования МСК на образцах в ростовой и остеогенной средах. Степень дифференцировки оценивали по окрашиванию образцов с клетками на щелочную фосфатазу реагентом BCIP/NBT и солей кальция — ализариновым красным. Формирование клетками солей кальция было выявлено во всех гелях при культивировании в остеогенной среде. Наиболее интенсивное окрашивание щелочной фосфатазы наблюдалось в образцах с 5 и 10% содержанием фиброина. В ростовой среде формирования солей кальция выявлено не было.

Полученные результаты дают основание предполагать, что разработанные нами биокомпозиты являются перспективным материалом, который может применяться для стимулирования регенерации дефектов костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы государственного задания FMFU-2024-0008.

Дворяшина И.А.✉, Великородная Ю.И.

Роль мезенхимальных клеток и сигнального пути HGF/c-Met в репаративной регенерации печени после химического фиброза

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

✉ idvoriashina@yandex.ru

Аннотация. Исследование регенерации печени в течение 12 недель после химически индуцированного фиброза показало, что мезенхимальные клетки и сигнальный путь HGF/c-Met участвуют в регенерации печени на фоне снижения пролиферативного потенциала гепатоцитов за счет активации клеточной пластичности.

Ключевые слова: регенерация печени; фиброз; мезенхимальные клетки; HGF/c-Met; виментин; клеточная пластичность.

Dvoryashina I.A., Velikorodnaya Yu.I.

The role of mesenchymal cells and the HGF/c-Met signaling pathway in reparative liver regeneration after chemical fibrosis

Volgograd State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Volgograd, Russia

Abstract. Study of liver regeneration over 12 weeks following chemically induced fibrosis revealed that mesenchymal cells and the HGF/c-Met signaling pathway are involved in liver regeneration against the background of reduced hepatocyte proliferative potential through the activation of cellular plasticity.

Keywords: liver regeneration; fibrosis; mesenchymal cells; HGF/c-Met; vimentin; cellular plasticity.

Регенерация печени является ключевым процессом, обеспечивающим восстановление её структуры и функций после повреждений. Хронические повреждения печени, вызванные воздействием токсичных веществ, вирусными инфекциями или аутоиммунными заболеваниями, могут приводить к развитию фиброза и цирроза, на фоне этих процессов регенераторный потенциал печени значительно снижается [1]. Изучение механизмов регенерации печени имеет важное значение в контексте регенеративной медицины, может открыть новые пути для разработки терапевтических стратегий, направленных на восстановление функций органа. В частности, изучение роли мезенхимальных клеток и сигнальных путей, таких как HGF/c-Met, которые участвуют в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и ремоделирования ткани во время регенерации, представляет значительный интерес. Эти механизмы могут быть использованы для целенаправленного воздействия на регенерацию, особенно в условиях хронического фиброза, когда традиционные методы лечения оказываются недостаточно эффективными. Таким образом, актуальность изучения регенерации печени в регенеративной медицине обусловлена не только фундаментальными вопросами биологии развития, но и значительным клиническим потенциалом для улучшения исходов лечения пациентов с тяжёлыми заболеваниями печени.

Цель нашего исследования — определить роль мезенхимальных клеток и сигнального пути HGF/c-Met в процессах репаративной регенерации печени после химически индуцированного фиброза.

Для нашего исследования выбрали модель химически индуцированного фиброза печени у крыс с использованием четыреххлористого углерода на фоне умеренной алкоголизации. Методом иммуногистохимического окрашивания определяли маркер мезенхимальных клеток виментин и c-Met как маркер активации сигнального пути HGF/c-Met ткани печени на различных стадиях восстановления для оценки процесса репаративной регенерации. Были сформированы четыре экспериментальные группы крыс: нулевая группа,

группа восстановления через 4 недели, группа восстановления через 8 недель и группа восстановления через 12 недель после прекращения токсического воздействия. В контрольную группу вошли взрослые интактные животные. Исследование проводилось на образцах медиальной доли печени, где фиброз был наиболее выражен.

Результаты исследования показали, что в процессе репаративной регенерации печени происходят значительные изменения в экспрессии ключевых маркеров. В частности, было выявлено увеличение удельной площади иммунопозитивного материала на виментин и с-Met в паренхиме печени на начальных стадиях регенерации. Максимальные значения экспрессии виментина и с-Met наблюдались в нулевой экспериментальной группе, до начала восстановительного периода, что подтверждает активацию этих маркеров в ответ на химическое повреждение печени. На 4-й неделе восстановления было отмечено формирование регенераторных розеток, содержащих мезенхимальные клетки, что может указывать на пластичность клеток печени в процессе регенерации [2], где мезенхимальные клетки способны дифференцироваться в эпителиальные клетки. На 12-й неделе восстановления наблюдалось значительное снижение удельной площади фиброзной ткани, нормализация цитоархитектоники печени и восстановление её функций. Эти данные подтверждают, что для большинства животных 12 недель является достаточным временем для полноценной регенерации печени после фиброза.

Выявленная активация сигнального пути HGF/c-Met и его связь с экспрессией виментина указывают на роль мезенхимальных клеток в регенерации печени в условиях подавления пролиферации гепатоцитов. Особое внимание следует уделить возможностям целенаправленного воздействия на сигнальный путь HGF/c-Met, при разработке новых терапевтических стратегий, направленных на стимуляцию регенеративных процессов в печени.

Исследование показало, что мезенхимальные клетки и сигнальный путь HGF/c-Met играют ключевую роль в регенерации печени после химического фиброза. Полученные данные могут быть использованы для разработки новых подходов в лечении хронических заболеваний печени, направленных на усиление регенерации и восстановление её функции. Это открывает новые горизонты в регенеративной медицине и подчеркивает необходимость дальнейшего изучения этих процессов.

Список литературы

1. Лохонина А.В., Ельчанинов А.В., Фатхудинов Т.Х. Изучение иммунофенотипа макрофагов разного происхождения в процессе регенерации печени // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2021. Т. 23, № 3. С. 138. EDN: CUPMMX
2. Мнихович М.В., Безуглова Т.В., Буньков К.В., и др. Роль эпителиально-мезенхимального перехода в формировании метастатического потенциала злокачественной опухоли на примере рака молочной железы // Вопросы онкологии. 2022. Т. 68, № 3. С. 251–259. EDN: KEUWEN doi: 10.37469/0507-3758-2022-68-3-251-259

Дебенюк С.С.^{1,2} ✉, Слизов П.А.¹

Протеины шелка тутового шелкопряда как перспективный биоматериал для регенеративной медицины

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет), Санкт-Петербург, Россия

✉ sdebenok@bk.ru

Аннотация. Протеины коконов тутового шелкопряда — серицин и фиброин — перспективны в производстве материалов для регенеративной медицины. Была проведена оценка молекулярной структуры протеинов шелка. Осуществлена оценка цитотоксичности белков *in vivo*. Запланированы дополнительные исследования белков.

Ключевые слова: фиброин; серицин; биосовместимость; регенеративная медицина.

Debenok S.S.^{1,2}, Slizhov P.A.¹

Mulberry silkworm silk proteins as a promising biomaterial for regenerative medicine

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State Technological Institute (Technical University), Saint Petersburg, Russia

Abstract. Silkworm cocoon proteins — fibroin and sericin are promising in the production of materials for regenerative medicine. The molecular structure of silk proteins was determined. The cytotoxicity of proteins *in vivo* was assessed. Additional studies of sericin and fibroin are planned.

Keywords: fibroin; sericin; biocompatibility; regenerative medicine.

Введение. Материалы природного происхождения имеют перспективу использования в регенеративной медицине благодаря таким свойствам, как биосовместимость и способность к биodeградации без образования токсичных для организма продуктов их разложения. Активно изучаются в последнее время возможности применения протеинов шелка тутового шелкопряда (*Bombyx mori*) в качестве функциональных биоматериалов [1].

Цель исследования. Охарактеризовать выделенные по разработанной нами технологии протеины шелка *Bombyx mori* по их компонентному составу и биологической активности.

Материалы и методы. Протеины шелка — серицин (SS) и фиброин (SF) — получали согласно методике с использованием папаина в фосфатно-буферном растворе, описанной в статье [2], с некоторыми модификациями. Оценка молекулярной структуры протеинов шелка осуществляли с помощью инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье (FTIR). Анализ влияния полученных протеинов шелка на жизнеспособность дермальных фибробластов человека (ДФ) проводили с помощью протокола оценки клеточного дыхания (Seahorse XF Cell Mito Stress Test Kit, Agilent Technologies, США).

Результаты. При оценке молекулярной структуры образцов протеинов шелка с помощью ИК-Фурье выявлены характерные амидные колебательные моды в области $1700\text{--}1590\text{ см}^{-1}$ (амид I — валентные колебания связей C=O), $1590\text{--}1460\text{ см}^{-1}$ (амид II — составные частоты деформационных колебаний связей N-H и валентных колебаний связей C-N) и $1280\text{--}1190\text{ см}^{-1}$ (амид III — валентные колебания связей C-N и плоскостные деформационные колебания связей N-H). Установлено, что преобладающей структурой в SF является β -листовая укладка. Выявлено отсутствие цитотоксичности кондиционированных сред SS и SF, а также дозозависимый характер их влияния на метаболическую активность ДФ.

Заключение. Представляется целесообразным проведение дополнительных теоретических и экспериментальных исследований, включая сравнительный анализ различных методов экстракции и получения SS и SF с оценкой их аминокислотной последовательности и молекулярной массы, физико-химических и биологических свойств, а также дальнейшую оптимизацию параметров и условий процессов их выделения.

Список литературы

1. Lyu Y., Liu Y., He H., Wang H. Application of silk-fibroin-based hydrogels in tissue engineering // Gels. 2023. Vol. 9, N 5. ID 431. doi: 10.3390/gels9050431
2. Feng Y., Lin J., Niu L., et al. High molecular weight silk fibroin prepared by papain degumming // Polymers. 2020. Vol. 12, N 9. ID 2105. doi: 10.3390/polym12092105

Демченко А.Г.¹ ✉, Балясин М.В.^{2,3}, Табаков В.Ю.¹, Амелина Е.Л.⁴, Смирнихина С.А.¹

Легочные органоиды из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток: перспективная модель для скрининга терапии муковисцидоза

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

² ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

⁴ ФГУ НИИ пульмонологии ФМБА, Москва, Россия

✉ demchenkoann@yandex.ru

Аннотация. Легочные органоиды из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека являются репрезентативной пациент-специфичной 3D-клеточной моделью муковисцидоза, позволяющей оценивать эффективность терапевтических препаратов для лечения муковисцидоза *in vitro*.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; органоиды; муковисцидоз; CFTR.

Demchenko A.G.¹, Balyasin M.V.^{2,3}, Tabakov V.Yu.¹, Amelina E.L.⁴, Smirnikhina S.A.¹

Lung organoids from induced pluripotent stem cells: a prospective model for screening cystic fibrosis therapy

¹ Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

² Endocrinology Research Center, Moscow, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

⁴ Federal Pulmonology Research Institute, Moscow, Russia

Abstract. Lung organoids derived from human induced pluripotent stem cells are a representative patient-specific 3D-cellular model of cystic fibrosis, allowing the evaluation of the efficacy of therapeutic agents for the treatment of cystic fibrosis *in vitro*.

Keywords: induced pluripotent stem cells; organoids; cystic fibrosis; CFTR.

Муковисцидоз (МВ) — одно из самых распространённых наследственных заболеваний, вызываемых мутациями в гене *CFTR*. Описано более 700 патогенных вариантов в гене *CFTR*, которые приводят к нарушениям в работе CFTR-канала (хлорный канал). Лечение МВ включает симптоматическую и патогенетическую терапию, при этом препараты патогенетической терапии одобрены только для части мутаций. Также на стадии разработок находится этиотропная терапия. При разработке лекарственных препаратов и для оценки их эффективности в восстановлении функции CFTR-канала необходимо наличие пациент-специфичных клеточных моделей. В рамках МВ актуально применять клеточные модели респираторного эпителия, поскольку чаще всего патология со стороны дыхательной системы является наиболее частой причиной летальных исходов при МВ. В данной работе в качестве клеточной модели МВ рассматриваются легочные органоиды (чиЛО), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (чипСК). Целью работы являлось исследовать пациент-специфичные чиЛО в качестве клеточной модели для скрининга терапии МВ, а также оценить точность метода, применяемого для анализа функциональной активности CFTR-канала, и сравнить ответ чиЛО на препараты патогенетической терапии с ответом пациента на терапию.

Для образования чиЛО, проводили дифференцировку чипСК пациентов с МВ (гомозиготная мутация F508del в гене *CFTR*), с получением NKX2.1+ легочных прогениторов и базальных клеток респираторного

эпителия (чиБК). Затем, из полученных культур клеток методом 3D-культивирования получали чиЛО [1, 2]. Эффективность восстановления функциональной активности CFTR-канала в чиЛО, полученных от пациентов с МВ, после воздействия препаратов патогенетической терапии, оценивали методом форсколин-индуцированного набухания (ФИН). Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism.

При воздействии на чиЛО, образованных из НКХ2.1+ прогениторов легких и чиБК, комбинаций модуляторов VX-809/VX-770 и VX-661/VX-770, после проведения ФИН наблюдалось слабое восстановление функциональной активности CFTR-канала (площадь чиЛО из НКХ2.1+ прогениторов легких увеличилась в 1,6 раза и 1,5 раза, соответственно; площадь чиЛО из чиБК увеличилась в 1,4 раза и 1,3 раза, соответственно). При воздействии тройной комбинации модуляторов, состоящей из VX-770/VX-661/VX-445 наблюдалось более эффективное восстановление функциональной активности CFTR-канала (площадь чиЛО из НКХ2.1+ прогениторов легких увеличилась в 2,2 раза; площадь чиЛО из чиБК увеличилась в 1,9 раза). Стоит отметить, что при проведении ФИН на чиЛО полученных от здоровых доноров площадь чиЛО из НКХ2.1+ прогениторов легких и чиБК увеличивается в 3,3 раз и 1,8 раза, соответственно. При проведении ROC-анализа результатов ФИН, точность метода составила 76,4%, чувствительность 65,9% и специфичность 71,8%. Кроме того, при сравнении ответа чиЛО с ответом на терапию модуляторами у пациента, из клеток которого образованы чиЛО, наблюдалась схожая динамика ответа на терапию модуляторами.

Результаты работы демонстрируют, что чиЛО являются репрезентативной 3D-клеточной моделью МВ, предсказывают ответ пациента на терапию модуляторами CFTR-канала и могут рассматриваться в качестве модели для *in vitro* скрининга терапии МВ.

Список литературы

1. Demchenko A., Kondrateva E., Tabakov V., et al. Airway and lung organoids from human-induced pluripotent stem cells can be used to assess CFTR conductance // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 7. ID 6293. doi: 10.3390/ijms24076293
2. Demchenko A., Belova L., Balyasin M., et al. Airway basal cells from human-induced pluripotent stem cells: a new frontier in cystic fibrosis research // *Front Cell Dev Biol.* 2024. Vol. 12. ID 1336392. doi: 10.3389/fcell.2024.1336392

Демьяненко С.В.

Регуляция активности фактора транскрипции с-Мус для выживания и восстановления нейронов

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

✉ demyanenkosvetlana@gmail.com

Аннотация. Ацетилирование с-Мус по лизину 148 играет ключевую роль в стабилизации структуры белка и в его взаимодействии с партнерами. В зависимости от характера и сроков повреждения происходит динамическое изменение взаимодействия с-Мус с FoxO1/3a, что приводит либо к апоптозу нейронов, либо к их репарации.

Ключевые слова: с-Мус; FoxO1/3a; посттрансляционное ацетилирование; инсульт; болезнь Альцгеймера; апоптоз; репарация.

Demyanenko S.V.

Regulation of c-Myc transcription factor activity for neuronal survival and recovery

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The lysine at the 148 position of c-Myc plays a key role in stabilizing of this protein and in its interaction with other proteins. Depending on the nature and timing of the damage, the Myc/FoxO interaction changes dynamically, which results in either neuronal apoptosis or repair.

Keywords: c-Myc; FoxO1/3a; post-translational acetylation; stroke; Alzheimer's disease; apoptosis; repair.

В зрелой центральной нервной системе (ЦНС) нейроны обладают способностью к структурной пластичности и прорастанию аксонов. Большой неожиданностью стали данные о способности факторов транскрипции p53, E2F1 или с-Мус, канцерогенный эффект которых лимитируется их способностью вызывать апоптоз нейронов, стимулировать регенерацию аксонов. Однако отсутствует понимание механизмов управления регенеративным и дегенеративным потенциалом таких мультифункциональных белков с неупорядоченной структурой (БНС). Существующая гипотеза предполагает, что нейродегенерация, как и клеточная пролиферация при раке — это заболевания неадекватного контроля клеточного цикла, важнейшим регулятором которого является с-Мус. Как объяснить разнообразные функции с-Мус при регенерации и дегенерации нейронов?

Функции БНС во многом зависят от их посттрансляционных модификаций, из которых наиболее древней и консервативной является ацетилирование в белках остатков лизинов.

Наши исследования показывают, что в нейронах ишемической пенумбры происходит увеличение ацетилирования с-Мус по N-концевому лизину 148 (K148), но не по C-концевому лизину 323 (K323) [1]. При этом ацетилтрансфераза p300 и деацетилаза SIRT2 в первую очередь влияют на ацетилирование K148, тогда как с-МусAcK323 деацетилируется HDAC2.

Молекулярно-динамическое моделирование показывает, что K148 играет решающую роль в стабилизации пространственной структуры с-Мус. Ацетилирование с-Мус по K148 способствует декомпактизации структуры с-Мус, потенциально ограничивая его проникновение в ядро, способствуя кальпаин-зависимому расщеплению белка в цитоплазме нейронов с образованием цитоплазматической укороченной формы белка Мус-nick.

Ацетилирование Мус-nick индуцирует ряд конформационных изменений, которые делают структуру пептида более упорядоченной. Таким образом, точечное ацетилирование по K148, несмотря на кажущуюся простоту (введение всего 5 атомов в структуру белка), может привести как к дестабилизации биополимера в полноразмерном с-Мус, так и к стабилизации Мус-nick. Мы предположили, что при развитии второго сценария Мус-nick становится более доступен для взаимодействия с другими цитоплазматическими белками, такими как α -тубулин. Взаимодействие Мус-nick с α -тубулином приводит к ацетилированию последнего путем привлечения гистонацетилтрансферазы GCN5, что стабилизирует микротрубочки, способствуя росту дендритов и аксонов [2]. Однако, исследования показали, что ацетилирование с-Мус-nick по K148 не оказывает существенного влияния на его связывание с α -тубулином и, вероятно, на последующее ацетилирование α -тубулина, что подтверждается нашими более ранними данными [3]. Вызванное ишемией повышение уровня ацетилирования с-Мус по K148 p300 может препятствовать его связыванию с MAX в ядрах клеток, не позволяя ему реализовать свой проапоптотический потенциал и способствовать его цитоплазматической транслокации. В связи с этим, стратегии, направленные на увеличение ацетилирования с-Мус по K148 за счет увеличения активности p300 или снижение активности SIRT2 могут повысить регенеративный потенциал дифференцированных нейронов после ишемии. Учитывая, что потеря p300 может компенсироваться его паралогом CBP (KAT3A) и PCAF, а также то, что в настоящее время отсутствуют селективные ингибиторы p300 с высокой биодоступностью, мы считаем, что использование селективных ингибиторов SIRT2, таких как AK7, AGK7, SirReal2, NPD11033 и т.д., разработанные для лечения рака, являются наиболее перспективными.

Другим способом регуляции функций с-Мус является его кооперация с белками-антагонистами FoxO1/3a. Как показали исследования на моделях болезни Альцгеймера и окислительного повреждения нейронов в зависимости от характера и сроков повреждения происходит динамическое изменение взаимодействия Мус/FoxO, что приводит либо к апоптозу нейронов, либо к репарации. Причем фосфорилирование или ацетилирование обоих белков-партнеров способно вызывать противоположные эффекты в зависимости от контекста.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 24-15-00268.

Список литературы

1. Guzenko V.V., Bachurin S.S., Dzreyan V.A., et al. Acetylation of c-Myc at lysine 148 protects neurons after ischemia // *Neuromolecular Med.* 2024. Vol. 26, N 1. ID 8. doi: 10.1007/s12017-024-08777-2
2. Dan W., Gao N., Li L., et al. α -Tubulin acetylation restricts axon overbranching by dampening microtubule plus-end dynamics in neurons // *Cereb Cortex.* 2018. Vol. 28, N 9. P. 3332–3346. doi: 10.1093/cercor/bhx225
3. Demyanenko S., Berezhnaya E., Neginskaya M., et al. Class II histone deacetylases in the post-stroke recovery period-expression, cellular, and subcellular localization-promising targets for neuroprotection // *J Cell Biochem.* 2019. Vol. 120, N 12. P. 19590–19609. doi: 10.1002/jcb.29266

Денисова Е.В.¹ ✉, Абрамович Р.А.²

Особенности производства биологических лекарственных препаратов с точки зрения регуляторной практики

¹ Департамент развития фармацевтической и медицинской промышленности Минпромторга РФ, Москва, Россия

² НПУ ИРМ МНОИ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ abr-rimma@yandex.ru

Аннотация. БМКП — биомедицинские клеточные продукты, ВТЛП — высокотехнологичные лекарственные препараты, включающие генотерапевтические лекарственные препараты, препараты на основе соматических клеток, препараты тканевой инженерии. Подходы к регистрации, контролю качества, производству и анализу рисков.

Ключевые слова: биомедицинские клеточные продукты; высокотехнологичные лекарственные препараты; регуляторная практика; регистрация; контроль качества; производство; анализ рисков.

Denisova E.V.¹, Abramovich R.A.²

Regulatory wise features of producing biological therapy medical products

¹ Ministry of Industry and Trade of Russia, Department of Pharmaceutical and Medical Industry Development, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. BCP — biomedical cell products, ATMP — advanced therapy medical product including gene therapy medical products, somatic cell therapy and tissue engineered products. Registration, quality management, manufacturing and risk management approaches.

Keywords: biomedical cell products; advanced therapy medical products; practical regulation; registration; quality control; manufacturing; risk management.

В современной фармацевтической практике России наряду с биомедицинскими клеточными продуктами (БМКП) используется еще и термин «высокотехнологичные лекарственные препараты» (ВТЛП). В мае 2023 года ЕЭК в эту категорию включил генотерапевтические лекарственные препараты, лекарственные препараты на основе соматических клеток, препараты тканевой инженерии. Данное действие привело к вопросу: является ли ВТЛП более широким понятием, которое включает в себя и биомедицинские клеточные продукты, содержащие живые клетки человека или животных. Рассмотрим различия и сходства в подходах к регистрации, контролю качества и производству между ВТЛП и БМКП.

Государственная регистрация ВТЛП регулируется Решением Совета ЕЭК № 78, с изменениями на 29 мая 2024 года, а также ФЗ № 61 в редакции от 30 января 2024 года [1, 2].

При этом в п. 5.1 Решения Совета ЕЭК №78 допускается применение незарегистрированных лекарственных препаратов (ВТЛП), изготавливаемых на нерутинной основе и применяемых на территории того же государства-члена в стационаре в целях индивидуального медицинского назначения, а в ФЗ № 61 в гл. 6, статья 13, ч. 5 не содержит в перечне нерегистрируемых препаратов ВТЛП, а содержит в п. 8. биотехнологические лекарственные препараты (БТЛП). Решение Совета ЕЭК не содержит в перечне нерегистрируемых препаратов БТЛП.

Регистрационные удостоверения БМКП, выданные в соответствии с ФЗ от 23.06.2016 года № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах», действительны до окончания срока их действия, но не позднее

31 декабря 2025 года. С 1 апреля 2024 года регулирование БМКП на основании Федерального закона от 4.08.2023 г. № 466, а также Постановлений правительств №384 и № 385 от 28.03.2024 [3–5].

Как и для БМКП основными требованиями к обеспечению качества ВТЛП являются асептическое производство и прослеживаемость сырья, всех исходных материалов, промежуточных продуктов и готового препарата. Стратегия контроля качества строится на риск-ориентированном подходе. Испытания в реальном времени в случае препаратов с коротким сроком годности. Допускается при производстве препаратов использовать сырье, материалы и компоненты, предназначенные для исследовательских целей, в тех случаях, когда аналогичных фармацевтического качества нет. Необходимо разработать спецификации и провести анализ рисков поставщиков. (Guidelines on Good Manufacturing Practice for Advanced Therapy Medicinal Products).

Производство ВТЛП регулируется решением Совета ЕЭК №77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза», а БМКП приказом МЗ РФ № 512 от 08.08.2018 «Об утверждении Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами». Лицензия на производство БМКП (сертификат GMP для ВТЛП) обязательны.

Общими при производстве ВТЛП и БМКП являются подходы к минимизации рисков, использованию по возможности закрытых систем, меры по предотвращению попадания вирусов.

Таким образом нормативно-правовое регулирование данных групп препаратов требует уточнения и доработки.

Список литературы

1. consultant.ru [Электронный ресурс]. Федеральный закон от 12.04.2010 № 61 «Об обращении лекарственных средств», ред. от 30 января 2024. Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/
2. docs.cntd.ru [Электронный ресурс]. Решение ЕЭК от 3.11.2016 № 78 «О правилах регистрации и экспертизы ЛС для медицинского применения». Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/456026097>
3. government.ru [Электронный ресурс]. Постановление правительства № 384 от 28.03.2024 г. «Об утверждении порядка обращения БМКП, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/152710/>
4. government.ru [Электронный ресурс]. Постановление правительства № 385 от 28.03.2024 «Об утверждении порядка и условий предоставления, подтверждения, отмены разрешения на производство и применение БМКП, предназначенных для исполнения индивидуального медицинского назначения». Режим доступа: <http://government.ru/docs/all/152712/>
5. publication.pravo.gov.ru [Электронный ресурс]. Федеральный закон от 4.08.2023 № 466-ФЗ «О внесении изменений в статью 4 ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Режим доступа: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202308040067>

Дергилев К.В.¹ ✉, Цоколаева З.И.^{1,2}, Зубкова Е.С.¹, Белоглазова И.Б.¹, Гольцева Ю.Д.^{1,2}, Ратнер Е.И.¹, Парфенова Е.В.^{1,3}

Использование секретомы клеток кардиосфер для направленной регуляции свойств клеток эпикардального микроокружения и репаративных процессов в сердце

¹ ФГБУ «НМИЦК им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитации», Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ kvdergilev@cardio.ru

Аннотация. Секретомы клеток кардиосфер может служить «инструментом» для воздействия на клетки эпикарда и восстановление сердца после повреждения. Прекодиционирование клеток кардиосфер с помощью TNF α способствует усилению репаративных свойств их секретомы.

Ключевые слова: кардиосфера; клетки эпикарда; репарация сердца.

Dergilev K.V.¹, Tsokolaeva Z.I.^{1,2}, Zubkova E.S.¹, Beloglazova I.B.¹, Goltseva Yu.D.^{1,2}, Ratner E.I.¹, Parfenova E.V.^{1,3}

Application of the Cardiosphere`S secretome for targeted regulation of epicardial CELL microenvironment and reparative processes in the heart

¹ FSBI «National medical research center of cardiology named after academician E.I. Chazov», Institute of Experimental Cardiology named after academician V.N. Smirnov, Moscow, Russia

² FSBI «Federal Scientific and Clinical Centre for Reanimatology and Rehabilitation», Moscow, Russia

³ Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The secretome of cardiosphere-derived cells (CDC) may serve as a «tool» to affect epicardial cells and repair the heart after damage. Preconditioning of CDC by TNF α promotes the reparative properties of their secretome.

Keywords: cardiosphere; epicardial cells; cardiac repair.

Сердечно-сосудистые заболевания остаются ведущими причинами заболеваемости, смертности и накладывают тяжелое бремя на экономику ведущих стран мира. В последние десятилетия традиционные методы лечения, включая модификацию образа жизни, использование фармацевтических препаратов и хирургических методов лечения позволили существенно улучшить качество и увеличить продолжительность жизни пациентов. Между тем, сложная «природа» сердечно-сосудистых заболеваний и ограниченная способность сердца к репарации диктует необходимость в разработке инновационных терапевтических подходов. Одним из таких подходов является использование секретомы прогениторных клеток, в частности клеток кардиосфер. Ранее, мы впервые показали, что под действием про- и противовоспалительных факторов секретомы клеток кардиосфер может существенно меняться, что позволяет его модифицировать для решения конкретных терапевтических задач [1]. В частности, обработка клеток кардиосфер TNF α способствует проангиогенному профилированию их секретомы, что было подтверждено в работах нашей группы [2]. На основании этих данных мы предположили, что секретомы клеток кардиосфер может служить инструментом для воздействия на клетки эпикарда, которые рассматриваются как важнейших координатор механизмов сердечной

репарации [3]. Цель данной работы является оценка воздействия секрета клеток кардиосфер (базового (сКС) и после прекондиционирования TNFa (TNFa сКС)) на клетки эпикарда и репаративные процессы в сердце после инфаркта миокарда. В работе использован секретом клеток кардиосфер, подготовленный в соответствии с ранее опубликованным протоколом [2]. Для экспериментов *in vivo* были использованы клетки эпикарда, полученные из сердец человека и мыши. Для тестирования *in vivo* использована модель инфаркта миокарда у мыши. Мы обнаружили, что сКС и TNFa сКС обладают цитопротективным действием на клетки эпикарда, предотвращая их гибель в условиях депривации и окислительного стресса. Помимо этого, TNFa сКС стимулировал активацию клеток эпикарда, их вступление в эпителиально-мезенхимальный переход, формирование эпикардальных клеток-предшественниц и усиление их миграции. Более того, при воздействии TNFa сКС на клетки эпикарда происходило провоспалительное и проангиогенное профилирование секрета клеток эпикарда: в нем увеличивается содержание цитокинов с провоспалительными и проангиогенными свойствами, а также его способность стимулировать ангиогенез в моделях *in vitro* и *in vivo*. Оценка влияния секрета клеток кардиосфер на активацию эпикарда *in vivo* на модели острого инфаркта показала, что интраперикардальное введение TNFa сКС способствует активации эпикарда и формированию специализированного эпикардального микроокружения, содержащего ключевые компоненты «клеточной ниши», формированию очагов роста сосудистых структур в направлении нижележащих отделов сердечной стенки, что способствует более активной ранней реваскуляризации миокарда, сохранению жизнеспособности части кардиомиоцитов и выражалась в увеличении доли жизнеспособного миокарда в зоне рубца. Таким образом, TNFa сКС способен оказывать таргетное воздействие на репаративные свойства клеток эпикарда, что может быть использовано для создания средств лечения кардиологических заболеваний нового типа.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-15-00540.

Список литературы

1. Dergilev K., Zubkova E., Beloglazova I., et al. Paracrine responses of cardiosphere-derived cells to cytokines and TLR ligands: A comparative analysis // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 24. ID 17278. doi: 10.3390/ijms242417278
2. Dergilev K., Zubkova E., Guseva A., et al. Tumor necrosis factor-alpha induces proangiogenic profiling of cardiosphere-derived cell secretome and increases its ability to stimulate angiogenic properties of endothelial cells // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 23. ID 16575. doi: 10.3390/ijms242316575
3. Foglio E., D'Avorio E., Nieri R., et al. Epicardial EMT and cardiac repair: an update // *Stem Cell Res Ther.* 2024. Vol. 15, N 1. ID 219. doi: 10.1186/s13287-024-03823-z

Дергилев К.В.¹, Азимова Е.Л.² ✉, Цоколаева З.И.^{1,3}, Белоглазова И.Б.¹, Болдырева М.А.¹, Ратнер Е.И.¹, Ярушкина И.С.², Парфенова Е.В.^{1,2}

Исследование воздействия клеточных пластов, сформированных из HGF-продуцирующих мезенхимальных стромальных клеток, на репаративные процессы в сердце после криповреждения

¹ ФГБУ «НМИЦ им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, НИИ экспериментальной кардиологии им. ак. В.Н. Смирнова, Москва, Россия

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

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитации», Москва, Россия

✉ eleonazimova@gmail.com

Аннотация. Трансплантация МСК-HGF-пласта после криповреждения миокарда вызывала активацию, усиление пролиферации клеток эпикарда, стимулировала раннюю васкуляризацию зоны повреждения и препятствовала патологическому ремоделированию. Применение МСК-HGF клеточных пластов может служить основой для разработки новых подходов лечения инфаркта миокарда.

Ключевые слова: фактор роста гепатоцитов; клетки эпикарда; криповреждение сердца; клеточные пласты; мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани.

Dergilev K.V.¹, Azimova E.L.², Tsokolaeva Z.I.^{1,3}, Beloglazova I.B.¹, Boldyreva M.A.¹, Ratner E.I.¹, Yarushkina I.S.², Parfenova E.V.^{1,2}

Investigation of epicardial HGF-MSC cell sheets transplantation on reparative processes in the heart after cryoinjury

¹ FSBI «National medical research center of cardiology named after academician E.I. Chazov», Institute of Experimental Cardiology named after academician V.N. Smirnov, Moscow, Russia

² FSBI «Moscow State University named after M.V. Lomonosov», Moscow, Russia

³ FSBI «Federal Scientific and Clinical Centre for Reanimatology and Rehabilitation», Moscow, Russia

Abstract. The transplantation of MSC-HGF cell sheets after myocardial cryoinjury was associated with the activation of epicardial cells, increased their proliferation, early vascularization of the injury zone and the prevention of pathological cardiac remodeling. The application of MSC-HGF cell layers may serve as a basis for the development of new approaches for the treatment of myocardial infarction.

Keywords: hepatocyte growth factor; epicardial cells; cardiac cryoinjury; cell sheets; adipose-derived mesenchymal stromal cells.

Инфаркт миокарда является ведущей причиной инвалидизации и смертности населения во всем мире. Несмотря на усовершенствование применяемых в клинической практике алгоритмов лечения, они не могут обеспечить долгосрочное улучшение сердечной функции, предотвратить патологическое ремоделирование и развитие сердечной недостаточности. В связи с этим значительное внимание привлекают новые подходы, направленные на активацию эндогенных механизмов репарации/регенерации, в частности направленные на клетки эпикарда сердца. Активация эпикарда сопровождается формированием прогениторных клеток, секрецией ростовых факторов, везикул/экзосом, которые воздействуют на сердечное микроокружение и генерируют сигналы, активирующие «регенеративную программу» в сердце. Активация клеток эпикарда представляется перспективной стратегией стимуляции эндогенных репаративных и регенеративных процессов в сердце. В этом направлении особый интерес представляет изучение эффектов локальной эпикардальной трансплантации простейших тканеинженерных конструкций, состоящих из пластов клеток

(англ. cell sheets) — своеобразных «клеточных заплаток», состоящих из многослойных клеточных структур в комплексе с наработанным ими же внеклеточным матриксом. Их терапевтические свойства могут быть существенно повышены за счет использования генетически модифицированных клеток, продуцирующих прорепаративные факторы. В ранее проведенных исследованиях лаборатории с помощью аденоассоциированного вирусного вектора, несущего ген HGF мыши, были получены клеточные пласты на основе МСК жировой ткани мыши, гиперпродуцирующие HGF (МСК-HGF), которые демонстрировали хорошую жизнеспособность и обеспечивали длительную продукцию трансгена [1]. На экспериментальной модели ишемии задней конечности было показано, что трансплантация клеточных пластов на основе МСК-HGF способствует восстановлению кровотока, васкуляризации и иннервации ишемизированных мышц, сокращает размер области некроза лучше, чем трансплантация пластов из немодифицированных МСК или введение суспензии МСК или МСК-HGF [1].

Целью данной работы было исследовать воздействие клеточных пластов, сформированных на основе МСК, гиперпродуцирующих фактор роста гепатоцитов, на клетки эпикарда и репаративные процессы в сердце после криоповреждения.

В работе использовались клеточные пласты 3 типов: без модификации, гиперпродуцирующие зеленый флуоресцентный белок GFP (МСК-GFP пласты) и HGF (МСК-HGF пласты). Пролиферацию MEC-1 клеток эпикардального мезотелия под действием секрета пластов в экспериментах *in vitro* оценивали с помощью программы NISai («Nikon») и Cell cycle assay. Активность клеток эпикарда *in vivo* оценивали с помощью иммуногистохимических/иммунофлуоресцентных методов окрашивания криосрезов сердца. Морфометрические показатели ремоделирования сердца обчисляли в программе ImageJ («NIH»).

Мы обнаружили, что 38 + 4% клеток эпикарда экспрессирует рецептор к HGF – C-met. При активации эпителиально-мезенхимального перехода в клетках эпикарда уровень C-met возрастал, детектировался на поверхности большинства клеток. Мы показали, что добавление кондиционированной среды МСК-HGF усилило пролиферацию клеток эпикарда *in vitro*, чего не наблюдалось при использовании контрольной среды и среды МСК-GFP. После криоповреждения сердца трансплантированные клеточные пласты интегрировались в сердечную ткань с формированием наружного слоя, покрытого новообразованными клетками эпикарда. Морфометрический анализ показал 6–7-кратное утолщение восстановившегося эпикарда в области рубца в сравнении с эпикардом сердец животных контрольной группы. Утолщение зоны эпикарда сопровождалось повышением числа Wt1+ и TBX+ прогениторных клеток, что указывало на их активацию и усиление пролиферации. После трансплантации МСК-HGF-пластов наблюдалась более интенсивная капилляризация зоны повреждения (на 5-й день после трансплантации) в сравнении с контрольной группой. В отличие от предыдущих работ по трансплантации пластов из МСК [2], где было показано уменьшение зоны постинфарктного фиброза, мы не обнаружили различия в площади зоны фиброза между группами, что может быть объяснено выбранной моделью криоповреждения. В то же время существенное снижение степени дилатации полости левого желудочка после трансплантации МСК-GFP и МСК-HGF-пластов свидетельствовало об уменьшении патологического ремоделирования и служило благоприятным прогностическим признаком снижения темпов прогрессирования сердечной недостаточности.

Таким образом, трансплантация МСК-HGF-пласта после криоповреждения миокарда вызывала активацию, усиление пролиферации клеток эпикарда, стимулировала раннюю васкуляризацию зоны повреждения и препятствовала патологическому ремоделированию. Применение МСК-HGF клеточных пластов может служить основой для разработки новых подходов лечения инфаркта миокарда. Работа выполнена при поддержке НИР, НИОКР № 124020700117-3 «Разработка васкуляризованных тканеинженерных конструкций на основе клеточных пластов для стимуляции регенеративных/репаративных процессов».

Список литературы

1. Boldyreva M.A., Shevchenko E.K., Molokotina Y.D., et al. Transplantation of adipose stromal cell sheet producing hepatocyte growth factor induces pleiotropic effect in ischemic skeletal muscle // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, N 12. ID 3088. doi: 10.3390/ijms20123088
2. Dergilev K.V., Shevchenko E.K., Tsokolaeva Z.I., et al. Cell sheet comprised of mesenchymal stromal cells overexpressing stem cell factor promotes epicardium activation and heart function improvement in a rat model of myocardium infarction // *Int J Mol Sci*. 2020. 21, N 24. ID 9603. doi: 10.3390/ijms21249603

Дзариева Ф.М.¹ ✉, Головин А.В.^{2,3}, Павлова Г.В.^{1,3,4}

Влияние EGFR и EGFRvIII-специфичного аптамера Gol1 на гены сигнальных путей клеток глиобластомы человека

¹ ФГБУН «Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук» Минобрнауки России, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГАУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия

⁴ ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России, Москва, Россия

✉ dz.fatima@mail.ru

Аннотация. Средняя продолжительность жизни пациентов с глиобластомой составляет 12–15 месяцев, что подчеркивает необходимость разработки новых методов диагностики и терапии заболевания. Одним из перспективных подходов является использование аптамеров как высокоспецифичных агентов к опухолевым клеткам.

Ключевые слова: глиома; глиобластома; аптамер; EGFR; EGFRvIII.

Dzarieva F.M.¹, Golovin A.V.^{2,3}, Pavlova G.V.^{1,3,4}

Effects of EGFR and EGFRvIII-specific aptamer Gol1 on signaling pathway genes in human glioblastoma cells

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Burdenko National Medical Research Center for Neurosurgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. The average life expectancy of patients with glioblastoma is 12–15 months, which emphasizes the need to develop new methods for diagnosing and treating the disease. One promising approach is the use of aptamers as highly specific agents to tumor cells.

Keywords: glioma; glioblastoma; aptamer; EGFR; EGFRvIII.

Глиобластома (ГБ) является самой агрессивной формой глиом. Это высокозлокачественная опухоль, характеризующаяся быстрым ростом, обширной инвазией и плохим прогнозом [1]. Согласно классификации ВОЗ 2021 года, к ГБ относят диффузные астроцитарные глиомы взрослых возрастных групп IV Grade (4ая степень злокачественности) с диким типом IDH1/2 [2]. Последние десятилетия стандартная методика терапии не подвергалась значительным изменениям, она включает в себя хирургическую резекцию опухоли с последующей химиолучевой терапией. При этом укоренившийся стандарт в терапии ГБ остается неэффективным, продлевая среднюю продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза на несколько месяцев [3].

В своей работе мы исследуем аптамеры как потенциальные молекулы для более эффективной терапии и диагностики ГБ. Аптамеры это короткие синтетические одноцепочечные нуклеиновые кислоты, обладающие высокой специфичностью к различным белкам-мишеням. Было произведено моделирование и синтез аптамера Gol1, обладающего высокой специфичностью к рецептору эпидермального фактора роста (EGFR)

и его мутантной форме — EGFRvIII. Данные рецепторы являются одними из ключевых молекул-мишеней в терапии и диагностики ГБ в настоящее время, особенно мутантная форма, так как она не встречается в клетках нормы.

Методом аптаиммуноцитохимии была продемонстрирована высокая специфичность аптамера Gol1 к EGFRvIII в клетках глиобластомы человека. Далее было оценено изменение пролиферативного потенциала клеток глиобластомы человека методом MTS-теста и при использовании клеточного анализатора в реальном времени. Под влиянием аптамера Gol1 наблюдалось значительное снижение пролиферации клеток глиобластомы человека, что не наблюдалось на клетках нормы. При этом антипролиферативный эффект коррелировал с уровнем экспрессии целевых рецепторов в различных клетках глиобластомы человека.

Помимо этого, было оценено изменение уровня экспрессии генов, участвующих в сигнальных путях, опосредуемых EGFR, методом ПЦР-РВ. В клетках глиобластомы человека с высоким уровнем экспрессии EGFRvIII под влиянием аптамера Gol1 наблюдалось снижение уровней экспрессии генов, связанных с пролиферацией и выживаемостью клеток (*Jun*, *Fos*, *CCND1*, *PI3K* и *Akt3*).

Также методом транскриптомного анализа мы провели оценку влияния аптамера Gol1 на пул клеток глиобластомы человека, который выживает после воздействия аптамером. Было продемонстрировано снижение экспрессии генов, участвующих в путях клеточного роста и различных ключевых РНК-процессов.

Таким образом, было показано, что аптамер Gol1 является потенциальной молекулой для более эффективной диагностики и терапии глиобластомы человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 75-15-2024-561).

Список литературы

1. Thakkar J.P., Dolecek T.A. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma // *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014. Vol. 23, N 10. P. 1985–1996. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-14-0275
2. Louis D.N., Perry A., Wesseling P., et al. 2021 WHO Classification of tumors of the central nervous system: a summary // *Neuro-oncology.* 2021. Vol. 23, N 8. P. 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
3. Stupp R., Mason W.P., van den Bent M.J., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma // *N Engl J Med.* 2005. Vol. 352, N 10. P. 987–996. doi: 10.1056/NEJMoa043330

Дзрелян В.А.¹ ✉, Бродский И.Б.¹, Сысоева В.Ю.¹, Климович П.С.^{1,2}, Рубина К.А.¹

Участие Т-кадгерина и активация сигнальных путей ERK и AMPK в процессе адипогенной дифференцировки

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

² НМИЦ кардиологии им. Чазова Минздрава России, Москва, Россия

✉ dzreyan2016@mail.ru

Аннотация. В данной работе исследовано содержание Т-кадгерина, а также уровень фосфорилирования киназ ERK и AMPK методом иммуноблоттинга на разных этапах адипогенной дифференцировки на модели культуры мышинных 3Т3-L1, коммитированных в адипоциты.

Ключевые слова: 3Т3-L1; Т-кадгерин; CDH13; ERK; AMPK; киназы; адипогенная дифференцировка; внутриклеточный сигналинг; фосфорилирование; метаболизм.

Dzreyan V.A.¹, Brodsky I.B.¹, Sysoeva V.Yu.¹, Klimovich P.S.^{1,2}, Rubina K.A.¹

Participation of T-cadherin and ERK/AMPK signaling pathways in adipogenic differentiation

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Chazov National Medical Research Centre of Cardiology, Moscow, Russia

Abstract. In summary, we studied the content of T-cadherin, as well as the phosphorylation level of ERK and AMPK by immunoblotting upon adipogenic induction at different stages using 3T3-L1 murine preadipocyte cell model.

Keywords: 3T3-L1; T-cadherin; CDH13; ERK; AMPK; kinase; adipocyte differentiation; cellular signaling; phosphorylation; metabolism.

Жировая ткань выполняет важную функцию накопления липидов, а также является эндокринным органом, секретирующим целый спектр гормонов, тем самым регулируя процессы метаболизма всего организма. Нарушение ее функционирования приводит к эктопическому накоплению жира, диабету и резистентности к инсулину. В связи с этим особенно важно изучать механизмы обновления клеток жировой ткани, индукции и регуляции дифференцировки стволовых клеток/клеток-предшественников в зрелые адипоциты, включая внутриклеточную передачу сигналов, которая влияет на адипогенную дифференцировку [1]. Т-кадгерин, также известный как кадгерин 13, Н-кадгерин и CDH13, является уникальным членом семейства белков кадгеринов и рецептором гормона жировой ткани — адипонектина, который секретируют зрелые адипоциты. Роль Т-кадгерина в обновлении клеточного состава и функционировании жировой ткани неизвестна.

Целью работы являлся анализ содержания Т-кадгерина, уровня фосфорилирования киназ ERK (extracellular signal-regulated kinase) и AMPK (AMP-activated protein kinase), как одних из основных механизмов регуляции адипогенной дифференцировки в ответ на стимулирующие сигналы на разных этапах адипогенеза на модели культуры мышинных 3Т3-L1, коммитированных в адипоциты, методом иммуноблоттинга.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень Т-кадгерина изменяется при индукции адипогенной дифференцировки и зависит от этапа дифференцировки (4–7 день): уровень белка в 3Т3-L1 клетках в адипогенной среде на всем протяжении эксперимента был значительно выше, чем в клетках в контрольной среде. При этом наблюдался постепенный рост уровня белка Т-кадгерина, достигая максимума на 10-е сутки. Содержание Т-кадгерина в клетках в контрольной среде на всем протяжении исследования практически не изменялось. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии Т-кадгерина в процессах адипогенной дифференцировки как на ранних, так и более поздних этапах.

Активированные путем фосфорилирования киназы AMPK и ERK участвуют во многих внутриклеточных процессах и фосфорилируют различные мишени, играющие роль в регуляции адипогенной дифференцировки, включая транскрипционные факторы C/EBP β и PPAR γ [1]. Мы оценивали активность киназ AMPK и ERK в полученных белковых лизатах клеток 3T3-L1 методом вестерн-блот на разных этапах адипогенной дифференцировки.

В последние годы все больше данных указывают на важную роль AMPK в подавление дифференцировки в адипогенном направлении [2]. Проведенный нами анализ методом вестерн блота показал, что уровень фосфорилирования AMPK имел схожую динамику как в адипогенных, так и в стандартных условиях: максимальный уровень фосфор-AMPK наблюдался в клетках, индуцированных в адипогенном направлении по сравнению с клетками в контрольной среде, на 7-е сутки, при этом базовый уровень фосфорилирования AMPK исходно был выше в клетках, при культивировании в контрольной среде.

Другой сигнальный каскад, активируемый инсулином и играющий роль в регуляции адипогенеза, представляет собой сигнальный путь Erk. Накопленные данные литературы свидетельствуют о стимулирующей роли Erk1/2-каскада в адипогенезе [1]. Интересно, что активация Erk1/2 на ранних стадиях дифференцировки стимулирует пролиферацию клеток и, по-видимому, имеет важное значение для нормального адипогенеза, однако на более поздних этапах дифференцировки Erk1/2 оказывает негативное влияние на процесс дифференцировки, ингибируя транскрипционную активность PPAR γ — основного гена адипогенной дифференцировки. Согласно полученным данным уровень фосфорилирования Erk1/2 на модели адипогенной дифференцировки клеток 3T3-L1 увеличивается и достигает максимума на 10-е сутки культивирования в адипогенной среде. Предполагается, что активация киназ Erk1/2 на ранних этапах необходима для нормальной дифференцировки в адипоциты.

Дальнейшее изучение молекулярных механизмов работы этих каскадов и способов их регулирования будет иметь важное значение ранней диагностики и профилактики ожирения.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 23-11-00205 «Биоинформационные исследования новых механизмов регуляции процессов морфогенеза жировой ткани с участием T-кадгерина».

Список литературы

1. Sysoeva V.Y., Lazarev M.A., Kulebyakin K.Y. et al. Molecular and cellular mechanisms governing adipogenic differentiation // Russ J Dev Biol. 2023. Vol. 54, N S1. P. S10–S22. doi: 10.1134/S1062360423070068
2. Chen H., Liu X., Chen H., et al. Role of SIRT1 and AMPK in mesenchymal stem cells differentiation // Ageing Res Rev. 2014. Vol. 13. P. 55–64. doi: 10.1016/j.arr.2013.12.002

Диденко Н.Н.¹ ✉, Долгалева А.А.¹, Бобрышев Д.В.¹, Чониашвили Д.З.², Адешелидзе С.Р.¹

Исследование биосовместимости новых образцов титанового сплава для дентальной имплантологии *in vitro*

¹ ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

² ФГБОУ ВО Северо-Осетинский государственный университет им. Коста Левановича Хетагурова, Владикавказ, Россия

✉ nikolai.n.didenko@gmail.com

Аннотация. В работе исследована пролиферативная активность клеток, культивируемых на образцах *in vitro* на экспериментальных образцах на основе титана BT 6 с различными видами поверхности. Полученные данные дают основания продолжить изучение биосовместимости новых экспериментальных образцов *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: дентальная имплантация; мезенхимные стволовые клетки; остеоинтеграция; титан; покрытие имплантата.

Didenko N.N.¹, Dolgaleva A.A.¹, Bobryshev D.V.¹, Choniashvili D.Z.², Adeshelidze S.R.¹

In vitro study of new titanium alloy samples biocompatibility for dental implantology

¹ FSBEU HE Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

² FSBEU HE North Ossetian State University named after Kosta Levanovich Khetagurov, Vladikavkaz, Russia

Abstract. The work investigated the proliferative activity of cells cultured *in vitro* on experimental samples based on titanium BT 6 with different types of surface. The data obtained provide grounds to continue studying the biocompatibility of new experimental samples *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: dental implantation; mesenchymal stem cells; osseointegration; titanium; implant coating.

Современная клиническая практика в стоматологии показывает, что адекватная обработка поверхностей имплантатов имеет решающее значение для качества остеоинтеграции и сокращения времени лечения [1]. Свойства поверхности дентальных имплантатов влияют на активность клеток на этапе заживления, что в конечном итоге определяет клинический прогноз имплантации [2, 3].

Первичную культуру МСК жировой ткани мыши получали путем ферментативной диссоциации коллагеназой (БиолоТ, 300 ЕД/мл, 37 °С, 4 часа) и культивировали в среде DMEM (БиолоТ) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS) (БиолоТ) в культуральных флаконах площадью 25 см² (Thermo Scientific) при 37 °С и 5% CO₂. Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения 80–90% конфлюэнтности монослы клетки отделяли с помощью 0,25% раствора трипсина (БиолоТ) и 0,02% раствора Версена (БиолоТ) в соотношении 1:1. В эксперименте использовались клетки на 4-м пассаже.

Исследование проводилось на следующих образцах материалов:

1. Образец титана BT 1.0 без покрытия;
2. Образец титанового сплава BT 6, лазерное сплавление, без покрытия;
3. Образец титанового сплава BT 6, сплавление электронным пучком, без покрытия;
4. Образец титанового сплава BT 6, лазерное сплавление, покрытие ALD, TiO₂, 25 нм;
5. Образец титанового сплава BT 6, сплавление электронным пучком, покрытие ALD, TiO₂, 25 нм;
6. Образец титанового сплава BT 6, покрытие ионно-плазменное. TiO₂, 2 мкм;
7. Образец титанового сплава BT 6, шайбы после резки;
8. Образец титанового сплава BT 6, шайбы после шлифовки.

Исследуемые образцы помещали в 24-луночный планшет. В каждую лунку планшета с образцами вносили 0,5 мл суспензии МСК. Клетки в лунках с образцами титана BT 1.0 без покрытия использовали как положительные контрольные. Планшет инкубировали в течение 24 часов при 37 °C и 5% CO₂.

Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. Образец каждого типа переносили после инкубации в другой 24-луночный планшет с 0,8 мл свежей среды DMEM. Затем к каждой лунке добавляли 80 мкл активированного раствора EZ4U и инкубировали при 37 °C и 5% CO₂ в течение 2 часов. После чего образцы извлекали и измеряли оптическое поглощение раствора с использованием многофункционального фотометра-имиджера Cytation1 (BioTek) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли оптическую плотность относительно положительного контроля в %. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения MS Excel 2016 с использованием t-критерия Стьюдента.

Наименьшей пролиферативной активностью обладали клетки, культивированные на образце 3 (95,27±5,025%, $t = 0,828$, $p > 0,1$). Клетки, культивированные на образцах 2, 4, 7 и 8, обладали пролиферативной активностью от 99,81±8,038% до 111,83±5,636% по сравнению с контролем, однако статистически достоверных отличий получено не было.

Наиболее достоверные результаты были получены при исследовании образцов 5 и 6. Клетки, культивированные на данных образцах, обладали более высокой пролиферативной активностью по сравнению с контролем (111,26±3,556%, $t = 2,517$, $p < 0,1$ и 112,39±4,298%, $t = 2,438$, $p < 0,1$ соответственно).

Для получения секрета МСК, культивированных на исследуемых материалах, образцы промывали раствором Хенкса, после чего переносили в 500 мкл стерильного фосфатного буфера в лунки 24-луночного планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре 24 ч, после чего супернатант аспирировали, фильтровали с использованием шприцевого фильтра с диаметром пор 0,2 мкм, и центрифугировали 20 мин при 2000 g.

Отобранный в последствии супернатант, содержащий секретом МСК, исследовали на содержание нуклеиновых кислот. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны 270 нм с референсной длиной волны 290 нм и выражали в процентах относительно положительного контроля.

Наиболее достоверные отличия были получены на образце 7 — содержание нуклеиновых кислот в секрете МСК было значительно ниже контрольной группы и составляло 73,59±1,20% ($t = 2,003$, $p < 0,2$).

Полученные данные дают основания продолжить изучение биосовместимости экспериментальных образцов *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы

1. Rausch M.A., Shokoohi-Tabrizi H., Wehner C., et al. Impact of implant surface material and microscale roughness on the initial attachment and proliferation of primary human gingival fibroblasts // *Biology*. 2021. Vol. 10, N 5. ID 356. doi: 10.3390/biology10050356
2. Inchingolo A.M., Malcangi G., Ferrante L., et al. Surface coatings of dental implants: A review // *J Funct Biomater*. 2023. Vol. 14, N 5. ID 287. doi: 10.3390/jfb14050287
3. Sarraf M., Rezvani Ghomi E., Alipour S., et al. A state-of-the-art review of the fabrication and characteristics of titanium and its al-loys for biomedical applications // *Biodes Manuf*. 2022. Vol. 5, N 2. P. 371–395. doi: 10.1007/s42242-021-00170-3

Долгополов И.С. ✉, Брюховецкий А.С., Коваленко Н.И., Ставров Д.С., Шипилова А.Н.

Иммунологические и генетические аспекты клинического применения эпигенетически модифицированных аутологичных гемопоэтических стволовых клеток (аГСК) при боковом амиотрофическом склерозе (БАС)

АО Клинический госпиталь «Нейровита», Москва, Россия

✉ irdolg@rambler.ru

Аннотация. При применении эпигенетически модифицированных *ex vivo* аутологичных гемопоэтических стволовых клеток с применением двуцепочечной ДНК человека у пациентов с БАС наблюдается нормализация субпопуляций CD34⁺ в костном мозге, а также тенденция к редукции клонов, несущих соматические мутации.

Ключевые слова: клональный гемопоэз неопределенного потенциала; боковой амиотрофический склероз; CD34⁺ стволовая клетка; эпигенетика; клональная реституция гемопоэза.

Dolgoplov I.S., Bryukhovetsky A.S., Kovalenko N.I., Stavrov D.S., Shipilova A.N.

Immunological and genetic implications of the clinical application of epigenetically modified autologous hematopoietic stem cells (aHSCs) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS)

JSC Clinical Hospital Neurovita, Moscow, Russia

Abstract. The reinfusion of autologous hematopoietic stem cells epigenetically modified *ex vivo* with human double-stranded DNA in ALS patients leads to normalization of bone marrow CD34⁺ subpopulations. A tendency to reducing clones with somatic mutation in driver genes was observed.

Keywords: clonal hematopoiesis of indeterminate potential; amyotrophic lateral sclerosis; CD34⁺ stem cell; epigenetics; clonal restitution of hematopoiesis.

БАС — смертельное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся прогрессирующей гибелью двигательных нейронов в головном и спинном мозге. Патология БАС не ограничивается автономными механизмами дегенерации нейрональных клеток. При БАС нейровоспаление играет критическую роль в прогрессировании заболевания. Нарушенные воспалительные реакции, характеризующиеся повышенной активацией микроглии и астроцитов, инфильтрацией лейкоцитами тканей головного и спинного мозга и избыточной секрецией провоспалительных цитокинов, способствуют нейродегенерации, наблюдаемой при БАС [2]. Нейровоспаление, особенно связанное с активностью и распределением различных субпопуляций Т-клеток, становится все более узнаваемым признаком БАС. Показана корреляция между уровнем CD4-Т-клеток с провоспалительным фенотипом Th1/Th17 и тяжестью заболевания, а также дисфункция Tregs у пациентов с БАС. В образцах ликвора обнаружено повышенное количество цитотоксических CD4-Т-клеток. Открытие феномена клонального гемопоэза неопределенного потенциала (CHIP) способно объяснить этиопатогенез нейровоспаления и нейродегенерации. CHIP — феномен, при котором гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК) приобретает одну или несколько соматических мутаций, которые дают ей конкурентное преимущество по сравнению со другими стволовыми клетками без этих мутаций, что приводит к формированию нескольких минорных клонов, экспансия которых постепенно вытесняет нормальный гемопоэз [3]. Воздействие реализуется через каскад воспалительных цитокинов (интерлейкины 1 бета, 2, 4, 6, 10, 18, 20,

интерферон гамма и альфа, фактор некроза опухоли альфа), инфламмосомы NLRP3, а также активацию или подавление некоторых сигнальных путей, определяющих клеточный цикл. Кроме того, играют роль воспалительные макрофаги (M1), вызывающие воспаление, фиброз и дегенерацию в различных органах и тканях. Описано 25 генов, связанных с СНР. Имеются данные о патологической роли дополнительных соматических мутаций (ДСМ) при БАС [4]. Наш подход заключался в подавлении иммуноопосредованных Т-клеточных реакций флюдарабином и дальнейшей реституции поликлонального гемопоэза эпигенетически модифицированными аутологичными ГСК, ранее забранными у пациентов путем лейкоцитафереза. Целью модификации *ex vivo* было введение всех реинфузированных ГСК в терминальную дифференцировку. В результате чего достигалось их выведение из фазы G0, формируемые ими нормальные клоны подавляли патологический, обеспечивая возврат к поликлональному кроветворению. Таким образом достигалось истощение патологического СНР клона ГСК и снижение активности нейровоспаления. Нами проанализированы результаты исследования костного мозга 10 пациентов с БАС до и после иммуномодулирующей терапии и клональной реституции ГСК. Длительность наблюдения составила 5±1 мес. ДСМ выявлялись методом NGS с анализом по генам DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, ASXL1, TET2, SF3B1, JAK2, AKT1, TP53, MTOR, CBL, PTEN, NANOG, а субпопуляции ГСК анализировались в пуле CD34+ клеток на проточном цитометре. Изучалась совместная экспрессия CD34 с CD38, CD2, CD13, CD61, CD41, CD19, CD123, CD33, CD56, CD10, CD7, CD117, CD44, HLA-DR, CD90, CD45, CD133. Десять здоровых доноров костного мозга составили контрольную группу. Медиана возраста в основной группе — 53,9±9,9 года, М:Ж = 4:6. При NGS ДСМ выявлены у 2 (20%): PTEN, rs35632884, VAF = 6% и DNMT3A, rs151168784, VAF = 3,9%. При этом частота ДСМ в этой возрастной группе не должна превышать 1–3%. Выявлено также 233 герминальные мутации (гомозиготные — 81 (35%), гетерозиготные — 152 (65%)). При сравнении субпопуляций CD34+ достоверной разницы перед началом терапии между основной и контрольной группами не обнаружено. Однако, после проведения клональной реституции отмечено достоверное увеличение субпопуляций CD34+CD13+ и CD34+CD123+ до и после терапии (66,3% vs. 77,8% и 6,3% vs. 12,5%, $p = 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно), и снижение уровня экспрессии CD34+CD44+ (70,8% vs. 29,8%, $p = 0,03$). При этом профиль ГСК костного мозга пациентов с БАС после терапии максимально приблизился к здоровым донорам. Клинически в группе отмечалась стабилизация заболевания у 4 (40%). В 6 случаях отмечено минимальное ухудшение. При оценке по функциональной рейтинговой шкале ALSFRS-R медиана составила 40±0 и 40±5 баллов до и после терапии при медиане наблюдения 5±1 мес. В настоящее время протокол терапии БАС пересмотрен и клональная реституция проводится последовательно с интервалом 2–3 мес. на протяжении 1 года. Параллельно применяется эпигенетическая терапия согласно профилю выявленных соматических мутаций. Возможность клональной реституции гемопоэза с помощью эпигенетически модифицированных аутологичных ГСК является привлекательной терапевтической опцией и открывает широкие перспективы для терапии не только нейродегенеративных заболеваний, но и атеросклероза, ожирения, аутоиммунных болезней, раннего остеопороза и других состояний, связанных с хроническим воспалением, включая старение.

Список литературы

1. McCauley M.E., Baloh R.H. Inflammation in ALS/FTD pathogenesis // *Acta Neuropathol.* 2019. Vol. 137, N 5. P. 715–730. doi: 10.1007/s00401-018-1933-9
2. Kwon H.S., Koh S.-H. Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes // *Transl Neurodegener.* 2020. Vol. 9, N 1. ID 42. doi: 10.1186/s40035-020-00221-2
3. Jaiswal S., Ebert B.L. Clonal hematopoiesis in human aging and disease // *Science.* 2019. Vol. 366, N 6465. ID eaan4673. doi: 10.1126/science.aan4673
4. Liu X., Xue H., Wirdefeldt K., et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and risk of neurodegenerative diseases // *J Intern Med.* 2024. Vol. 296, N 4. P. 327–335. doi: 10.1111/joim.20001

Домнина А.П.✉, Кунеев И.К., Корнилова А.И., Соколова А.В., Иванова Ю.С., Нащекина Ю.А., Люблинская О.Г.

Пациент-специфичные трехмерные клеточные модели тканей матки

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ aldomnina@mail.ru

Аннотация. С использованием клеточных сфероидов из мезенхимных стромальных клеток эндометрия и целлюлозного каркаса разработана функциональная 3D-модель эндометрия человека. Показана возможность применения целлюлозных каркасов и клеточных культур для создания пациент-специфичных моделей тканей матки.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки эндометрия; клеточные сфероиды; целлюлозная матрица; эндометрий; гладкомышечные клетки; миометрий.

Domnina A.P., Kuneev I.K., Kornilova A.I., Sokolova A.V., Ivanova Ju.S., Nashchekina Y.A., Lyublinskaya O.G.

Patient-specific three-dimensional cell models of uterine tissues

Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Using cell spheroids from endometrial mesenchymal stromal cells and cellulose scaffold, a functional 3D model of human endometrium was developed. The possibility of using cellulose scaffolds and cell cultures to create patient-specific models of uterine tissues is shown.

Keywords: endometrial mesenchymal stromal cells; cell spheroids; cellulose matrix; endometrium; smooth muscle cells; myometrium.

Актуальным направлением современной медицины является переход к персонализированному подходу лечения заболеваний, в том числе в гинекологии. Данный переход невозможен без разработки пациент-специфичных моделей тканей органов женской репродуктивной системы, создаваемых на основе биологического материала больных. Приоритетом при решении этой задачи является неинвазивность процедуры забора материала, возможность проведения многократно повторяемых экспериментов и скринингов препаратов на материале конкретного донора, а также релевантность создаваемых моделей. При моделировании эндометрия — внутренней слизистой оболочки матки, наименее инвазивным способом выделения клеток является использование участков эндометрия, содержащихся в менструальной крови. В настоящее время показана возможность выделения клеточных популяций из менструальной крови и их культивирования в 2D и 3D структурах, приближенных к структуре эндометрия. Недавно, нами была разработана технология формирования стандартизированных по размеру сфероидов из мезенхимных стромальных клеток эндометрия человека (ЭМСК), с узко дисперсным распределением по размеру, позволяющая сформировать сфероиды заданного размера [1]. Клетки в составе сфероидов сохраняли фенотипические свойства стромы эндометрия, а также способность к тканеспецифичной децидуальной дифференцировке. Однако, было обнаружено, что длительное культивирование ЭМСК в виде сфероидов снижает их жизнеспособность, что ограничивает сроки экспериментов, поэтому нами были использованы целлюлозные скаффолды растительного происхождения в качестве основы для трехмерного роста клеток. Для приближения к нативным условиям, поверхность скаффолдов была модифицирована коллагеном. Целлюлоза является биосовместимым материалом, обладает механической прочностью и эластичностью, может иметь различную структуру и форму. Нами были разработаны методы получения децеллюляризованных целлюлозных каркасов из мякоти яблока и их коллагенизации [2]. При заселении ЭМСК в целлюлозные каркасы клетки сохраняли жизнеспособность, пролиферативную активность, экспрессию характерных поверхностных маркеров, способность к направленной децидуальной дифференцировке [2].

Была разработана технология заселения каркасов ЭМСК-сфероидов. С использованием этой технологии была получена функциональная 3D модель стромы эндометрия, содержащая основные клеточные компоненты и экстраклеточный матрикс, характерные для эндометрия человека, а также характеризующаяся плотностью клеточного материала, сравнимой с нативной тканью. Функциональность данной модели подтверждена способностью клеток в составе конструкции отвечать на гормональную стимуляцию тканеспецифической децидуальной дифференцировкой, а также характерными изменениями при моделировании 28-дневного менструального цикла *in vitro*.

Для детального исследования изменения свойств клеток при переходе к 3D-культивированию и их приближенности к состоянию клеток в исходной ткани интереса — эндометрии, проводилось сравнение профилей экспрессии генов ЭМСК при различных способах культивирования (в стандартных условиях клеточного монослоя, в виде клеточных сфероидов, в виде клеточных сфероидов, инкорпорированных в целлюлозный 3D скаффолд). Полученные результаты сравнивались с профилем экспрессии генов в образцах нативного эндометрия человека. В результате было установлено, что 3D-культуры ЭМСК в сфероидов характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов — маркеров децидуализации, таких как пролактин (PRL) и IGFBP1, а так же проангиогенных факторов VEGF и VEGFR2, что косвенно свидетельствует о коммитированности к децидуализации или появлению субпопуляций децидуально дифференцированных клеток при переходе к 3D культивированию в сферах.

Были отработаны протоколы 3D-кокультивирования ЭМСК и клеток HUVEC и обнаружено сохранение жизнеспособности обоих клеточных типов при совместном их культивировании в составе целлюлозного скаффолда, а также взаимная миграция и формирование тубулярных структур из клеток HUVEC.

Апробированы способы моделирования ткани миометрия матки с использованием скаффолдов, изготовленных из разных частей пера лука. Подобные скаффолды характеризуются выраженной направленностью целлюлозных волокон, что способствует моделированию нативной структуры мышечной ткани. С использованием этих скаффолдов нами была доказана возможность 3D-культивирования гладкомышечных клеток миометрия мыши. Обнаружено, что клетки сохраняют жизнеспособность, способность к пролиферации и экспрессию характерных маркеров гладких мышц.

Полученные данные свидетельствуют о пригодности каркасов из децеллюляризованных растений, модифицированных коллагеном и заселяемых клеточными сфероидов, для создания трехмерных моделей тканей матки. Результаты исследования имеют важное значение для разработки трехмерных клеточных моделей тканей человека *in vitro* для фундаментальных и прикладных исследований и переходу к персонализированной медицине будущего в гинекологии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-74-10126.

Список литературы

1. Domnina A., Alekseenko L., Kozhukharova I., et al. Generation of therapeutically potent spheroids from human endometrial mesenchymal stem/stromal cells // J Pers Med. 2021. Vol. 11, N 6. ID 466. doi: 10.3390/jpm11060466
2. Kuneev I.K., Ivanova Y.S., Nashchekina Y.A., et al. Development of a method for three-dimensional culturing of human mesenchymal stem (stromal) cells using a cellulose matrix // Cell Tiss Biol. 2023. Vol. 17. P. 388–397. doi: 10.1134/S1990519X2304003X

Дорофеева А.И.✉, Шипунова И.Н., Никифорова К.А., Гальцева И.В., Лучкин А.В., Фидарова З.Т., Михайлова Е.А.

Влияние тромбоцитопении на свойства стромальных предшественников кроветворного микроокружения при апластической анемии

Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава РФ, Москва, Россия

✉ resnichka22-22@mail.ru

Аннотация. Аплазия костного мозга приводит к развитию тромбоцитопении и, как следствие, к снижению уровня PDGFBB в крови больных апластической анемией. Недостаток PDGFBB может вызывать нарушение пролиферации стромальных предшественников кроветворного микроокружения

Ключевые слова: кроветворное микроокружение; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; апластическая анемия; сыворотка крови.

Dorofeeva A.I., Shipounova I.N., Nikiforova K.A., Galtseva I.V., Luchkin A.V., Fidarova Z.T., Mikhailova E.A.

The influence of thrombocytopenia on the properties of stromal precursor cells of the hematopoietic microenvironment in aplastic anemia

National Medical Research Center for Hematology, Ministry of Health, Moscow, Russia

Abstract. Bone marrow aplasia leads to the thrombocytopenia and, as a consequence, to a decrease in the blood PDGFBB level in aplastic anemia. PDGFBB deficiency may result in impaired proliferation of stromal precursor cells of the hematopoietic microenvironment

Keywords: hematopoietic microenvironment; multipotent mesenchymal stromal cells; aplastic anemia; blood serum.

Кроветворение происходит в костном мозге (КМ) при тесном взаимодействии кроветворных предшественников с компонентами микроокружения. Функциональное микроокружение формируется в результате пролиферации мезенхимных стромальных клеток. При некоторых гематологических заболеваниях происходит нарушение пролиферативных свойств стромальных предшественников, однако в большинстве случаев не удается установить, являются эти изменения причиной или следствием патологического процесса. Апластическая анемия (АА) — редкое заболевание, при котором аутоиммунная атака на стволовую кроветворную клетку приводит к развитию аплазии КМ и панцитопении. Известно, что мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), выделенные из КМ больных АА и культивируемые в стандартных условиях, характеризуются сниженной скоростью пролиферации по сравнению с ММСК здоровых доноров. Возможно, нарушение пролиферации ММСК происходит в результате воздействия факторов внутренней среды организма больных. Чтобы охарактеризовать это воздействие, в данном исследовании было изучено влияние сыворотки крови больных АА на рост ММСК здоровых доноров. Для этого ММСК доноров ($n = 3$) культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки каждого из больных в дебюте ($n = 43$) или здоровых доноров ($n = 8$), в стандартных условиях в течение 7 дней, после чего количество клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Полученные значения оптической плотности (OD) отражают общее количество клеток. Для сопоставления результатов экспериментов, выполненных на разных культурах ММСК, значения OD нормировали на среднее по всем донорам, определяя относительный индекс роста (ОИР) ММСК. ОИР ММСК в присутствии сыворотки больных АА оказался достоверно ниже, чем в присутствии сыворотки

здоровых доноров ($0,36 \pm 0,01$; $1,0 \pm 0,05$, соответственно). Значит, сыворотка больных не способна к полноценному поддержанию роста ММСК. Подсчет количества клеток при культивировании выявил увеличение времени удвоения популяции ММСК в среднем в 3,4 раза при инкубации в присутствии сыворотки больных АА по сравнению с сывороткой доноров ($7,1 \pm 2,1$; $2,1 \pm 0,3$ дня, соответственно; $n = 3$). Определение доли ММСК на стадии раннего (аннексин V+ пропидий йодид– ММСК) и позднего апоптоза (аннексин V + пропидий йодид + ММСК) методом проточной цитофлуориметрии не выявило различий между группами на 1, 4 и 6-й день инкубации клеток в среде с сывороткой больных АА или здоровых доноров ($n = 5$). Следовательно, нарушение роста стромальных предшественников в присутствии сыворотки больных АА происходит в результате замедления пролиферации клеток, а не за счет индукции их гибели. Корреляционный анализ зависимости ОИР ММСК в присутствии сыворотки больных от показателей общего (клинического) анализа крови этих больных на момент получения образцов выявил выраженную корреляционную связь со значениями тромбокрита ($0,68$), а также с количеством тромбоцитов в крови ($0,71$). Тромбоцит — это показатель, который отражает объемную долю тромбоцитов в крови и зависит от количества тромбоцитов (коэффициент корреляции между двумя показателями у больных АА составил $0,91$). То есть полученные результаты отражают прямую взаимосвязь ОИР ММСК в присутствии сыворотки больных с уровнем тромбоцитов в образцах их крови. Тромбоциты являются источником большого числа активных молекул, в том числе фактора роста эндотелия сосудов альфа (VEGFA) и фактора роста, выделенного из тромбоцитов (PDGFBB), который необходим для пролиферации стромальных клеток. Иммуноферментный анализ выявил сниженный уровень VEGFA и PDGFBB в сыворотке крови больных АА (45 ± 5 и 69 ± 5 пг/мл, соответственно) по сравнению со значениями у доноров (71 ± 14 и 112 ± 21 пг/мл, соответственно), что позволило предположить взаимосвязь недостатка этих факторов с нарушением способности сыворотки больных к поддержанию пролиферации ММСК. Добавление в среду инкубации, содержащую 10% сыворотки больных АА, 1% лизата тромбоцитов здорового донора или 100 нг/мл рекомбинантного фактора PDGFBB приводило к увеличению ОИР ММСК до уровня, получаемого при инкубации в присутствии сыворотки доноров, а добавление VEGFA не имело эффекта ($n = 4$). То есть нарушение способности сыворотки крови больных АА к поддержанию пролиферации ММСК здоровых доноров связано с недостатком секретируемого тромбоцитами фактора PDGFBB. Итак, тромбоцитопения приводит к снижению уровня PDGFBB в крови больных АА, что может вызывать нарушение пролиферации стромальных предшественников кровяного микроокружения.

Дорофеева А.И.¹, Савватеева Т.Ф.², Шипунова И.Н.¹ ✉

Возрастные изменения спектра дифференцировочного потенциала индивидуальных колоний стромальных предшественников из костного мозга человека

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

✉ ira9ship@gmail.com

Аннотация. Цель работы — анализ изменений индивидуальных клонов КОЕф зависимости от возраста и пола донора. Показано, что с возрастом в костном мозге женщин наблюдается утрата монопотентных адипогенных предшественников. Для всех доноров также показано возрастное истощение пула бипотентных предшественников.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; костный мозг человека; колониеобразующие единицы фибробластов; дифференцировочный потенциал; бипотентные предшественники; остеогенная дифференцировка; адипогенная дифференцировка; экспрессия генов; ПЦР в реальном времени.

Dorofeeva A.I.¹, Savvateeva T.F.², Shipounova I.N.¹

Age-related changes in the spectrum of differentiation potential of individual colonies of stromal precursors from human bone marrow

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. We analyzed the changes in individual CFU-F clones depending on the age and gender of the donor. It has been shown that with age, loss of monopotent adipogenic precursors is observed in the bone marrow of women. Age-related depletion of the pool of bipotent precursors is also shown for all donors.

Keywords: mesenchymal stromal cells; human bone marrow; colony-forming units of fibroblasts; differentiation potential; bipotent precursors; osteogenic differentiation; adipogenic differentiation; gene expression; real-time PCR.

В здоровом костном мозге (КМ) человека нормальное функционирование стволовых кроветворных клеток (СКК) обеспечивается в кроветворных нишах. Ниша — специфическое микроокружение для СКК — состоит из стромальных клеток, внеклеточного матрикса и растворимых факторов. Все компоненты кроветворной ниши важны для поддержания СКК. В нашей работе мы исследовали мезенхимные стромальные предшественники — клетки, дающие начало практически всем зрелым клеткам стромального микроокружения. Функционально в культуре выделяют два типа стромальных предшественников: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки и их потомки, колониеобразующие единицы фибробластов (КОЕф). Известно, что оба типа предшественников под действием соответствующих индукторов способны дифференцироваться в костном, жировом и хрящевом направлениях и обладают достаточно высокой способностью к пролиферации.

Цель работы — анализ изменения спектра дифференцировок индивидуальных клонов КОЕф в зависимости от возраста и пола донора.

Из образцов КМ 19 доноров (8 женщин и 11 мужчин, 14–52 лет, медиана 28 лет), было получено и проанализировано 292 индивидуальных клон КОЕф. Все доноры подписали информированное согласие. Клетки

каждого клона рассаживали на 3 ячейки: контроль, костная и жировая дифференцировки. Способность к дифференцировкам определяли по изменению ОУЭ генов *FABP4* (жировая) и *ALPL* (костная дифференцировка) в клетках, подвергшихся индукции. В контрольных клетках клонов оценивали ОУЭ генов *NES*, *IL10*, *ANGP1*, *KITLG*, *VCAM1*, *TGFB1*, *FGFR1*, *IL1B*. Значимость различий определяли t-критерием Стьюдента или U-критерием Манна-Уитни. Достоверными считали различия при $p < 0,05$. Корреляцию с возрастом оценивали по коэффициенту корреляции Пирсона. Связь представленности типа предшественника с возрастом или с полом, а также значимость ОУЭ проанализированных генов определяли регрессионным анализом.

При сравнении клонов КОЕф, выделенных из КМ мужчин и женщин, оказалось, что в КМ мужчин значительно выше концентрация монопотентных адипогенных стромальных предшественников ($15 \pm 5\%$ против $4 \pm 2\%$ у женщин). При этом у женщин прослеживается четкая корреляция с возрастом ($R = -0,7$), а у мужчин такой корреляции нет ($R = 0,01$). Доля бипотентных (19%) и монопотентных остеогенных (27%) предшественников в КМ мужчин и женщин не различалась, а доля клонов, не ответивших на индукцию дифференцировки, была на 10% выше в КМ женщин ($53 \pm 8\%$ против $43 \pm 11\%$ у мужчин, $p = 0,5$). Регрессионный анализ выявил, что для предшественников всех типов, выделенных из КМ женщин, характерен высокий ОУЭ гена *TGFB1*, а КОЕф из КМ мужчин на высоком уровне экспрессируют ген *VCAM1*.

Анализ спектра дифференцировок КОЕф в зависимости от возраста донора показал, что у более молодых доноров выше доля бипотентных стромальных предшественников, а с увеличением возраста заметно повышается доля предшественников, не способных ответить на индукцию дифференцировки. Регрессионный анализ показал, что для колоний из КМ более молодых доноров характерен высокий ОУЭ гена *FGFR1*, а в бипотентных и монопотентных остеогенных — еще и гена *TGFB1*. Экспрессия этого гена снижается с возрастом в монопотентных адипогенных предшественниках, а также в КОЕф, не ответивших на индукцию дифференцировки. Для всех типов предшественников характерно ассоциированное с возрастом снижение ОУЭ гена *KITLG*.

Полученные результаты позволяют предположить, что в КМ женщин наблюдается ассоциированная с возрастом утрата монопотентных адипогенных предшественников. Также показано возрастное истощение пула бипотентных предшественников. Изменение клеточного состава кроветворной ниши может объяснять изменения, происходящие в кроветворной системе с возрастом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 22-15-00018), <https://rscf.ru/project/22-15-00018/>.

Доценко Е.Д.✉, Толстова Т.В., Русанов А.Л., Лузгина Н.Г.

Влияние активации TLR3 на иммуносупрессивные свойства мезенхимальных стромальных клеток

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, Москва, Россия

✉ ek.dotsenko28@gmail.com

Аннотация. Активация TLR3 в МСК приводит к повышенной продукции иммуномодулирующих факторов (IDO, TNFAIP6, IL-4 и др.), согласно результатам ПЦР-РВ и ИФА. Преколонизирование позволяет усилить иммуносупрессивные эффекты МСК в отношении Т-клеток и кондиционной среды от МСК в отношении M1/M2 макрофагов.

Ключевые слова: МСК; иммуносупрессия; преколонизирование; Toll-подобный рецептор 3.

Dotsenko E.D., Tolstova T.V., Rusanov A.L., Luzgina N.G.

Evaluation of TLR3 activation on immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Abstract. Activation of TLR3 in MSCs results in increased production of immunomodulatory factors, such as IDO, TNFAIP6, and IL-4. This was confirmed by qRT-PCR and ELISA. Preconditioning of MSCs allows for enhancement of the immunosuppressive effects of MSCs on T cells and of the conditioned medium from MSCs on M1/M2 macrophages.

Keywords: MSC; immunosuppression; priming; Toll-like receptor 3.

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) обладают уникальными регенеративными и иммуномодулирующими свойствами. Однако, высокая гетерогенность МСК обуславливает ряд ограничений в их терапевтическом применении. Одной из стратегий для преодоления неоднородности популяции клеток, а также придания им целевого функционального статуса является преколонизирование. Так, Toll-подобные рецепторы (TLR) в МСК реагируют на вирусную нагрузку, что приводит к секреции иммуносупрессивных или провоспалительных молекул. Экспрессия противовоспалительных факторов, в свою очередь, может модулироваться в зависимости от выбранных режимов экспериментального воздействия лигандов TLR. Целью данной работы являлось исследование влияния активации TLR3 на иммуносупрессивные свойства МСК в отношении модельных иммунных клеток.

Впервые показано, что активация TLR3 в МСК с использованием 10 мкг/мл полиинозиловой : полицитидиловой кислоты (poly(I : C)) в течение 3 ч приводит к увеличению продукции иммуносупрессивных факторов. В частности, экспрессия *индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)*, *стимулируемого фактором некроза опухоли гена 6 (TNFAIP6)*, *простагландин-Е синтазы 2 (PTGES2)* и секреция IL-4 и простагландина-2 (PGE2) достоверно возрастали в преколонизированных МСК (пМСК), согласно результатам ПЦР-РВ и ИФА, соответственно. Данные факторы участвуют в регуляции активации эффекторных клеток иммунной системы и опосредуют противовоспалительный ответ МСК. Так, IDO1 играет роль в метаболизме триптофана, важного субстрата для Т-клеток, а PGE2 и TSG-6 участвуют в ингибировании пролиферации/активации этих клеток. Вероятно поэтому активация TLR3 приводила к усиленным иммуносупрессивными свойствам пМСК в отношении модельных Т-клеток при их совместном культивировании. В частности, методом проточной цитометрии было показано, что пМСК эффективнее интактных клеток снижали активацию и пролиферацию клеток Jurkat, индуцируя апоптоз. При этом, использование кондиционной среды от пМСК (пКС) позволяло

поддерживать баланс модельных M1/M2 макрофагов, полученных путем дифференцировки и/или активации клеток ТНР-1. Впервые обнаружено, что уровень секреции M1-макрофагами провоспалительных цитокинов (IL-1 β , TNF- α) был ниже в результате их обработки пКС, чем в случае воздействия КС от интактных МСК. Кроме того, наиболее значимое повышение продукции IL-4 в КС от макрофагов и экспрессии генов-маркеров M2-фенотипа (*MRC1*, *IL10*, *TGFB1*, *VEGF*) отмечали при воздействии пКС на M0 макрофаги.

Таким образом, протокол трёх часового прекондиционирования МСК с использованием 10 мкг/мл poly(I : C) приводил к усиленным иммуносупрессивным эффектам пМСК в отношении модельных Т-клеток и пКС в отношении M1/M2-макрофагов. Такой подход является перспективной стратегией для преодоления гетерогенности стволовых клеток и получения на их основе терапевтических агентов для лечения аутоиммунных заболеваний, связанных с хроническим воспалением.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).

Дудорова А.А.¹ ✉, Балясин М.В.², Марков Н.М.¹, Новиков М.М.³, Ефименко М.В.¹, Люндуп А.В.²,
Осипова Е.Ю.¹, Фадеева И.В.⁴

Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека в 3D-культурах на скаффолдах из трикальций-фосфата

¹ НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева, Москва, Россия

² Научно-образовательный ресурсный центр «Клеточные технологии» РУДН, Москва, Россия

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ Институт металлургии и материаловедения им. А.А.Байкова, РАН, Москва, Россия

✉ dudorova_aa@mail.ru

Аннотация. В 3D-культурах МСК после остеогенной дифференцировки увеличились отложения кальция и наблюдалась положительная окраска на AP. Полученные результаты показывают перспективность скаффолдов из трикальцийфосфата для использования в регенеративной медицине для восстановления поврежденных костных тканей.

Ключевые слова: МСК; остеогенез; ализариновый красный; щелочная фосфатаза; трикальций-фосфат; аддитивное производство.

Dudorova A.A.¹, Balyasin M.V.², Markov N.M.¹, Novikov M.M.³, Efimenko M.V.¹, Lyundup A.V.²,
Osipova E.Yu.¹, Fadeeva I.V.⁴

Osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stromal cells in 3D cultures on tricalcium phosphate scaffolds

¹ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

² Research and Educational Resource Center for Cellular Technologies, RUDN University, Moscow, Russia

³ National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

⁴ A.A. Baikov IMET RAS, Moscow, Russia

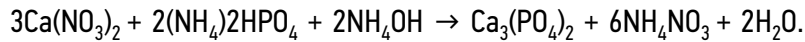
Abstract. In 3D cultures of MSCs after osteogenic differentiation, calcium deposits increased and positive AP staining was observed. The results obtained show the promise of tricalcium phosphate scaffolds for use in regenerative medicine to restore damaged bone tissue.

Keywords: MSCs; osteogenesis; alizarin red; alkaline phosphatase; tricalcium phosphate; additive manufacturing.

В настоящее время основными методами лечения дефектов кости являются имплантация ауто- или аллографтов и применение недеградируемых имплантатов, которые имеют ряд значительных недостатков. Технологии тканевой инженерии позволяют преодолевать эти ограничения и стимулируют регенерацию костной ткани при больших дефектах, обусловленных травмой или патологией костей. В работе представлены результаты исследования жизнеспособности и остеогенной дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при культивировании в 3D-культурах на скаффолдах из трикальцийфосфата.

Керамика из трикальцийфосфата (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) используется в медицине для восстановления поврежденных костных тканей [1]. Остеокондуктивные свойства определяются наличием связанной системы макропор (размером не менее 100 мкм), необходимых для циркуляции жидкостей организма, а также для остеointegrации имплантата с окружающей костной тканью. Для создания изделий заданной геометрии из керамики с пористой структурой использовали метод стереолитографии, который позволяет по трехмерной

цифровой модели изготавливать керамические образцы для биологических экспериментов. ТКФ синтезировали осаждением из водных растворов солей по реакции с последующей термообработкой при 900°C.



Полученный порошок ТКФ смешивали с акриловой фотополимерной композицией, оптимизированной для излучения 405 нм. 3D-печать материала проводили с помощью LCD принтера на фторопластовой ленте. Для удаления полимера и спекания керамики проводили обжиг при температурах 600 и 1200°C.

МСК костного мозга культивировали в среде Alpha-MEM с добавлением 10% FBS. Для оценки жизнеспособности МСК в 3D-культурах клетки на поверхности матрикса визуализировали при помощи окрашивания на живые и мертвые клетки красителями Hoechst 44432 и Propidium iodide. Для дифференцировки МСК в остеогенном направлении после 3–4 пассажа в среду добавляли компоненты Osteogenic Stimulatory Kit (STEMCELL Technologies) в соответствии с инструкцией к набору. Дифференцировку культуры клеток в остеогенном направлении определяли окрашиванием кальциевых отложений ализариновым красным S (ARS), и по активности щелочной фосфатазы (AP). Интенсивность окрашивания оценивали при помощи микроскопии на имиджере Celena X в программе CellProfiler версии 4.2.5 [2]. Полуколичественную оценку остеогенной дифференцировки в культурах клеток проводили с помощью экстракции ARS и AP из образцов матрикса с последующим колориметрическим анализом при длинах волн 405 и 520 нм соответственно [3].

В результате окрашивания на живые и мертвые клетки было показано, что МСК равномерно распределены на поверхности матрикса, при этом клетки прикреплены как к горизонтальным, так и вертикальным областям, заполняя доступные поры. Клетки сохраняли жизнеспособность, большая часть клеток не окрашивалась на PI. Поры матрикса способствуют остеогенезу, некоторые поры были заполнены кальциевыми отложениями. В образцах матрикса, засеянных культурой клеток МСК после остеогенной дифференцировки увеличилось отложение кальция и наблюдалась положительная окраска на AP в сравнении с контрольными культурами без добавления остеогенных индукторов. Прирост интенсивности окрашивания ARS экстракта матрикса с культурой клеток после остеогенной дифференцировки относительно контрольных МСК без остеогенной дифференцировки составил 2,04 раз ($p < 0,01$), результат нормировали на мг веса матрикса. Прирост интенсивности окрашивания AP составил 3,48 раза ($p < 0,01$). При этом в обоих случаях наблюдалось фоновое окрашивание пустого матрикса.

Полученные результаты показывают перспективность скаффолдов из трикальцийфосфата для использования в регенеративной медицине для восстановления поврежденных костных тканей.

Список литературы

1. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // Успехи химии. 2010. Т. 79, № 1. С. 15–32. EDN: KYIRWD
2. Lamprecht M.R., Sabatini D.M., Carpenter A.E. CellProfiler™: free, versatile software for automated biological image analysis // Biotechniques. 2007. Vol. 42, N 1. P. 71–75. doi: 10.2144/000112257
3. Bernar A., Gebetsberger V., Bauer M., et al. Optimization of the Alizarin Red S assay by enhancing mineralization of osteoblasts // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 24, N 1. ID 723. doi: 10.3390/ijms24010723

Дылева Ю.А., Белик Е.В., Учасова Е.Г., Горбатовская Е.Е., Долматова С.Е., Груздева О.В.✉

Оценка плеотропных эффектов метформина на уровень церамидов в адипоцитах жировых депо сердца у пациентов с ишемической болезнью сердца

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», Кемерово, Россия

✉ o_gruzdeva@mail.ru

Аннотация. Цель — оценить *in vitro* влияние 1 и 10 ммоль/л метформина на уровень церамидов в адипоцитах локальных жировых депо сердца пациентов с ИБС. Метформин, преимущественно в концентрации 1 ммоль/л, модулирует секреторную активность адипоцитов ЖТ сердца и сосудов, снижая уровень кардио-негативных церамидов.

Ключевые слова: церамиды; метформин; эпикардальная жировая ткань; периваскулярная жировая ткань; ишемическая болезнь сердца.

Dyleva Yu.A., Belik E.V., Uchasova E.G. Gorbatovskaya E.E., Dolmatova S.E., Gruzdeva O.V.

Assessment of the pleotropic effects of metformin on the level of ceramides in adipocytes of heart fat depots in patients with coronary artery disease

Federal State Budgetary Scientific Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract. The aim — to evaluate *in vitro* the effect of 1 and 10 mmol/l of metformin on the level of ceramides in the adipocytes of local fat depots of heart in patients with CAD. 1 mmol/l Metformin modulates the secretory activity of adipocytes AT of heart, reducing level of cardioneegative ceramides.

Keywords: ceramides; metformin; epicardial adipose tissue; perivascular adipose tissue; coronary heart disease.

Метформин (N,N-диметилимиддикарбоимиддиамида) — препарат первой линии лечения сахарного диабета 2 типа (СД2), однако, потенциал его применения гораздо шире. Экспериментальные, клинические, популяционные исследования и различные метаанализы показали, что метформин обладает плеотропной активностью и положительно влияет на модифицируемые сердечно-сосудистые факторы риска, такие как ожирение, инсулинорезистентность, гипергликемия, гиперинсулинемия и дислипидемия [1–3]. Показано, что лейотропные эффекты скорее всего опосредуются через способность препарата подавлять дифференцировку адипоцитов и модулировать их функциональную активность, уменьшая воспаление жировой ткани [4]. Однако, остается не ясным, каковы плеотропные эффекты препарата на локальные жировые депо сердца (эпикардальное и перикоронарное), способен ли модулировать функциональную активность адипоцитов данной локализации и регулировать синтез церамидов, ассоциированных с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В связи с чем, задачей данного исследования было изучить *in vitro* возможные эффекты метформина в различных концентрациях (1 и 10 ммоль/л) на содержание церамидов в подкожных, эпикардиальных и периваскулярных адипоцитах пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. В исследование было включено 30 пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС). Средний возраст пациентов составил 64,9 (47,8; 69,5) года. Все пациенты имели показания для проведения прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования (КШ). В исследование не включали пациентов старше 75 лет, с наличием клинически значимых сопутствующих патологий (сахарного диабета 1-го и 2-го типа, инфаркта миокарда, анемии, почечной и печеночной недостаточности, онкологических

и инфекционно-воспалительных заболеваний в период обострения, аутоиммунных заболеваний). Во время операции КШ были получены образцы ЖТ подкожной, эпикардиальной (правые отделы сердца) и периваскулярной (область правой коронарной артерии) локализации. Изолированные адипоциты из полученных образцов ЖТ культивировали в течение суток с добавлением различной концентрации метформина 1 и 10 ммоль/л и без добавления метформина. Церамидный состав ЖТ сердца пациентов методом жидкостной хроматографии в комбинации с масс-спектрометрией методом множественных реакций (MRM). Идентификация церамидов проведена с помощью скриптов LipidMatch с использованием номенклатуры липидов LipidMaps. Статистический анализ проводился с помощью программы Statistica 9.0. Выявлено, что содержание Cer d18:1/16:0 было выше в ЭЖТ по сравнению с ПЖТ и ПВЖТ, Cer d18:1/18:0 — по сравнению с ПЖТ, Cer d18:1/22:0 и Cer d18:1/24:1 в ЭЖТ и ПВЖТ по сравнению с ПЖТ. Содержание “протективного” Cer d18:1/24:0 было низким в ЭЖТ и ПВЖТ. При оценке воздействия метформина в концентрации 1 и 10 ммоль/л выявлена модуляция уровня церамидов в адипоцитах ЖТ сердца. Метформин обладал однонаправленным эффектом как в низкой, так и в высокой концентрации, однако влияние 1 ммоль/л было более выражено. Так, у пациентов с ИБС наблюдалось статистически значимое снижение Cer d18:1/16:0 ($p = 0,021$), Cer d18:1/18:0 ($p = 0,016$), Cer d18:1/20:0 ($p = 0,002$) Cer d18:1/22:0 ($p = 0,027$) и Cer d18:1/24:1 ($p = 0,020$) в ЭЖТ, Cer d18:1/18:0 ($p = 0,010$) и Cer d18:1/20:0 ($p = 0,023$) в ПВЖТ, а так же повышение уровня Cer d18:1/23:0 ($p = 0,011$) в ЭЖТ, Cer d18:1/24:0 в ЭЖТ ($p = 0,024$) и ПВЖТ ($p = 0,030$). Метформин в концентрации 10 ммоль/л снижал только уровень Cer d18:1/18:0 в ЭЖТ ($p = 0,039$) и Cer d18:1/22:0 в ПВЖТ ($p = 0,023$). В адипоцитах ПЖТ метформин снижал лишь уровень Cer d18:1/22:0, 22:2, 22:4, 22:5. Так согласно полученным данным метформин преимущественно в концентрации 1 ммоль/л улучшает секреторную активность адипоцитов в большей степени эпикардиальной и периваскулярной локализации у пациентов с ИБС. Таким образом, метформин способен модулировать уровень церамидов в этих жировых депо, что является перспективной стратегией для поддержания баланса кардионегативных и кардиопротективных церамидов в ЖТ данной локализации.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-15-20007 «Церамидный профиль локальных жировых депо сердца: клиничко-патогенетическое значение и терапевтический потенциал» и средств Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

Список литературы

1. Solymar M., Ivic I., Poto L., et al. Metformin induces significant reduction of body weight, total cholesterol and ldl levels in the elderly — a meta-analysis // PLoS ONE. 2018. Vol. 13. ID e0207947. doi: 10.1371/journal.pone.0207947
2. Han Y., Xie H., Liu Y., et al. Effect of metformin on all-cause and cardiovascular mortality in patients with coronary artery diseases: A systematic review and an updated meta-analysis // Cardiovasc Diabetol. 2019. Vol. 18. ID 96. doi: 10.1186/s12933-019-0900-7
3. Halabi A., Sen J., Huynh Q., Marwick T.H. Metformin treatment in heart failure with preserved ejection fraction: a systematic review and meta-regression analysis // Cardiovasc Diabetol. 2020. Vol. 19. ID 124. doi: 10.1186/s12933-020-01100-w
4. Drzewoski J., Hanefeld M. The current and potential therapeutic use of metformin — the good old drug // Pharmaceuticals (Basel). 2021. Vol. 14, N 2. ID 122. doi: 10.3390/ph1402012

Дьячкова У.Д. ✉, Басалова Н.А., Виговский М.А., Лазарев Р.Е., Попов В.С., Лагерева Е.А.,
Ефименко А.Ю., Григорьева О.А.

Разработка моделей для оценки биологической активности нового антифибротического препарата на основе везикулярной фракции секрета мезенхимных стромальных клеток человека

Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ dyachkovauliana@gmail.com

Аннотация. Для контроля биологической активности нового класса антифибротических препаратов на основе внеклеточных везикул мезенхимных стромальных клеток человека разработаны релевантные модели *in vitro*: подавление дифференцировки фибробластов кожи человека и переключения поляризации макрофагов человека.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; мезенхимные стромальные клетки; биологическая активность; фиброз; клеточные модели; биораспределение.

Dyachkova U.D., Basalova N.A., Vigovskiy M.A., Lasarev R.E., Popov V.S., Lagereva E.A., Efimenko A.Yu.,
Grigorieva O.A.

In vitro models for biological activity evaluation of a new antifibrotic drug based on the vesicular fraction of the human mesenchymal stromal cells secretome

Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Relevant *in vitro* models were developed for biological activity control of a new class of antifibrotic drugs based on human mesenchymal stromal cells extracellular vesicles: suppression of human skin fibroblasts differentiation and switching human macrophages polarization.

Keywords: extracellular vesicles (EVs); mesenchymal stromal cells (MSCs); biological activity; fibrosis; *in vitro* cellular models; biodistribution.

Фиброзирование является одним из основных механизмов репарации тканей в постнатальном развитии млекопитающих. Однако прогрессирование фиброза может приводить к развитию патологий, с которыми ассоциированы до половины смертей в развитых странах. Мезенхимные стромальные клетки (МСК), обнаруженные в большинстве органов и тканей, являются ключевыми регуляторами поддержания гомеостаза и управления регенерацией и репарацией тканей, в первую очередь, за счет своей паракринной активности. Ранее нами было показано, что действие фракции секретиромы МСК внеклеточных везикул (ВВ), переносящих специфические некодирующие микроРНК, способно подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты — основные эффекторные клетки фиброза [1]. Введение ВВ МСК мышам с легочным фиброзом, индуцированным блеомицином, за счет межклеточного переноса miR-29c и miR-129 приводило к снижению накопления миофибробластов и активированных фибробластов и разрешению фиброза [2]. Эти данные легли в основу разработки оригинального биологического лекарственного препарата, содержащего ВВ МСК человека, для которого, согласно решению Совета ЕЭК №77, необходимо изучить параметры биораспределения и разработать методы контроля качества по стандартным показателям, как и для препаратов на основе малых молекул, а также по дополнительным параметрам, таким как биологическая активность, на релевантных моделях.

Прижизненное наблюдение за накоплением флуоресцентного сигнала в легких мышей с блеомицин-индуцированным фиброзом после интратрахеального введения ВВ МСК, меченых PKH26/DiR, показало, что сигнал обнаруживается и сохраняется в легких в течение, как минимум, трех часов после введения. Используя метод иммуногистохимического анализа полутонких срезов легких, мы обнаружили, что большая часть ВВ МСК, введенных интратрахеально, сококализована с CD68-положительными макрофагами легких, и лишь малая часть находится в клетках, экспрессирующих белок активированных фибробластов альфа (FAP α). Интересно, что ВВ МСК после интратрахеального введения практически не обнаруживались в клетках, содержащих альфа-гладкомышечный актин (α SMA), накопление которого считается основным маркером миофибробластов. Полученные данные позволяют предположить, что *in vivo* ВВ МСК могут оказывать свой эффект опосредованно, за счет влияния на поляризацию макрофагов легких и дифференцировку активированных фибробластов, что может быть одним из механизмов действия разрабатываемого препарата. Таким образом, для оценки биологической активности препарата на основе ВВ МСК были разработаны две *in vitro* модели: модель TGF β -индуцированной дифференцировки фибробластов кожи человека в миофибробласты и модель поляризации макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови человека. В первой модели действие трансформирующего фактора роста бета (TGF β -1) на фибробласты приводило к накоплению FAP α предшественниками миофибробластов через 24 часа, что говорит об их активации, а также к увеличению уровня α SMA и его встраивание в стресс-фибриллы спустя 96 часов. При этом, одновременное действие TGF β -1 и ВВ МСК достоверно снижало как количество α SMA+ стресс-фибрилл, которое оценивали методом иммуноцитохимического анализа, так и уровень α SMA, измеренного методом вестерн-блоттинга, по сравнению с TGF β -1 стимулированными фибробластами. Во второй модели действие ВВ МСК на провоспалительный подтип макрофагов M1, стимулированных LPS и TNF α , приводило к снижению уровня экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-12p35, TNF α), и увеличению уровня экспрессии и секреции противовоспалительного цитокина IL-10, что является признаком переключения типа поляризации в сторону противовоспалительных M2-макрофагов.

Разработанные модели могут быть использованы для оценки биологической активности антифибротического препарата на основе ВВ МСК, а также для понимания механизмов его действия, направленных на подавление дифференцировки миофибробластов и переключение поляризации макрофагов, обуславливающих острое и хроническое воспаление.

Исследование было выполнено в рамках Государственного задания МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова (изучение биораспределения ВВ МСК и их влияния на дифференцировку МФ и поляризацию макрофагов) и поддержано грантом РФФИ 23-15-00198 (изучение влияния ВВ МСК на активированные предшественники МФ).

Список литературы

1. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., et al. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated micrnas within extracellular vesicles // *Cells*. 2020. Vol. 9, N 5. ID 1272. doi: 10.3390/cells905127
2. Basalova N., Arbatskiy M., Popov V., et al. Mesenchymal stromal cells facilitate pulmonary fibrosis resolution by miR-29c and miR-129 intercellular transfer // *Exp Mol Med*. 2023. Vol. 55. P. 1399–1412. doi: 10.1038/s12276-023-01017-w

Дьячкова У.Д.¹✉, Гарджук А.А.¹, Евдокимов П.В.², Мурашко А.М.², Ефименко А.Ю.¹, Григорьева О.А.¹

Тканеспецифичность внеклеточного матрикса, секретлируемого мезенхимными стромальными клетками человека, и его использование для увеличения индуктивных свойств остеопластических материалов

¹ Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Химический факультет, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ dyachkovauliana@gmail.com

Аннотация. Источник получения мультипотентных стромальных клеток (МСК) определяет тканеспецифичность их внеклеточного матрикса (ВКМ). Децеллюляризованный ВКМ МСК пульпы зуба обладает высокими остеоиндуктивными свойствами, а также усиливает индуктивные свойства остеопластических материалов на основе биокерамики.

Ключевые слова: внеклеточный матрикс; остеопластика; мультипотентные стромальные клетки; пульпа зуба; остеогенная дифференцировка; децеллюляризация.

Dyachkova U.D.¹, Gardzhuk A.A.¹, Evdokimov P.V.², Murashko A.M.², Efimenko A.Yu.¹, Grigorieva O.A.¹

Tissue specificity of human mesenchymal stromal cells extracellular matrix and its application as enhancer of osteoplastic materials inductive properties

¹ Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

Abstract. The source of multipotent stromal cells (MSC) determines extracellular matrix (ECM) tissue specificity. Decellularized ECM dental pulp MSC demonstrates high osteoinductive properties, and also enhances the inductive properties of bioceramic osteoplastic materials.

Keywords: extracellular matrix; osteoplasty; multipotent stromal cells; dental pulp; osteogenic differentiation; decellularization.

Процессы обновления и восстановления тканей после повреждения в организме находятся под контролем мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК). Считается, что основной эффект МСК опосредован секрецией паракринных факторов, наиболее представленной фракцией которых являются компоненты внеклеточного матрикса (ВКМ). При этом МСК могут быть выделены из разных тканей, что определяет тканеспецифичные свойства не только самих клеток, но и компонентов их секретомы, в том числе белков, входящих в состав ВКМ. Перспективным источником МСК считается пульпа зуба человека, так как по литературным и нашим собственным данным клетки, выделенные из пульпы третьих моляров, обладают повышенной способностью к пролиферации и большим потенциалом к остеогенной дифференцировке в сравнении с МСК жировой ткани человека. Нами был отработан протокол получения децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ) от МСК пульпы. Мы показали, что культивирование мультипотентных стволовых клеток на полученном дВКМ МСК пульпы обеспечивает повышение базального уровня экспрессии мастер-гена остеогенной дифференцировки RUNX2, а индукция их остеогенной дифференцировки приводит к отложению соединений кальция уже через 8 суток, что говорит о ранней индукции

остеогенной дифференцировки и высоких остеоиндуктивных свойствах дВКМ МСК пульпы. Поэтому мы использовали ВКМ этих клеток для покрытия керамических биоматериалов на основе трикальцийфосфата, которые часто применяются в качестве остеопластических материалов. Мы показали, что биоматериал на основе трикальцийфосфата поддерживает адгезию и выживаемость МСК пульпы зуба, а также обеспечивает возможность образования монослоя, что необходимо для получения на поверхности данных биоматериалов клеточного пласта и его децеллюляризации. дВКМ на поверхности биоматериалов содержит в своем составе основные матричные белки: коллаген I типа, фиб-ронектин, ламинин и EDA-фибронектин. Мы оценили вклад дВКМ МСК пульпы в улучшение биологических характеристик выбранных керамических биоматериалов, в частности, их остеоиндуктивных свойств. Культивирование мультипотентных клеток на трикальцийфосфат-содержащих биоматериалах, покрытых дВКМ МСК пульпы, приводило к росту активности щелочной фосфатазы в клетках в сравнении с культивированием клеток на пластике, а также на непокрытых образцах биокерамики. На основании полученных данных мы предполагаем, что дВКМ МСК пульпы способствует улучшению остеоиндуктивных свойств используемых керамических биоматериалов. Таким образом, функционализированные с помощью дВКМ биоматериалы обеспечивают эффективную остеогенную дифференцировку мультипотентных стволовых клеток, даже без дополнительных индукционных стимулов, что важно для дальнейшей трансляции технологии в клиническую практику.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-79-10103, <https://rscf.ru/project/23-79-10103/> и при поддержке Государственного задания МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова.

Евсеева М.Н.^{1,2} ✉, Шилова А.А.¹, Рубцов Ю.П.², Кулебякин К.Ю.¹

Гомеобоксный фактор транскрипции Hhex регулирует накопление жира в гепатоцитах

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии Наук, Москва, Россия

✉ m.n.evseeva@yandex.ru

Аннотация. Процесс накопления жира гепатоцитами (стеатоз) напоминает адипогенез. Ранее мы показали, что подавление фактора транскрипции Hhex приводит к подавлению адипогенеза преадипоцитов *in vitro*. В настоящей работе с помощью липосом с микроРНК к Hhex удалось остановить развитие стеатоза на модели *in vivo*.

Ключевые слова: Hhex; стеатоз; гепатоциты; преадипоциты; PPAR γ .

Evseeva M.N.^{1,2}, Shilova A.A.¹, Rubtsov Yu.P.², Kulebyakin K.Yu.¹

Homeobox transcription factor Hhex regulates lipid accumulation in hepatocytes

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Accumulation of lipids in hepatocytes (steatosis) resembles adipogenesis. We previously showed that homeobox factor Hhex downregulation inhibits adipogenesis in preadipocytes *in vitro*. In this study, we successfully used liposomes with microRNA to Hhex to stop the development of steatosis *in vivo*.

Keywords: Hhex; steatosis; hepatocytes; preadipocytes; PPAR γ .

По данным Всемирной организации здравоохранения жировая инфильтрация печени (стеатоз) затрагивает до 32% взрослого населения планеты. Процесс накопления жира в клетках печени развивается с признаками трансформации гепатоцитов и приобретения ими ряда свойств адипоцитов. В частности, отмечено повышение уровней мРНК и белка адипоцитарных маркеров (PPAR γ), aP2, CD36, IL-6, IL-18 и снижение экспрессии характерных для гепатоцитов E-кадгерина и альбумина [1]. Учитывая эти данные, мы предположили, что процесс накопления жира в гепатоцитах регулируется таким же образом, как и в преадипоцитах. К настоящему моменту в работах *in vitro* установлено множество регуляторов, подавление которых оказывает влияние на процесс адипогенеза. Однако для некоторых этих регуляторов их функциональное значение в исследованиях *in vivo* не подтвердилось [2,3]. В наших работах мы показали, что гомеобоксный фактор транскрипции Hhex поддерживает дифференцировку преадипоцитов мыши и человека: подавление Hhex приводит к почти полной блокировке адипогенеза. Данный эффект достигается за счёт опосредованного ингибированием Hhex подавления белка PPAR γ — ключевого фактора адипогенной регуляции [4,5].

Можно предположить, что по аналогии с преадипоцитами, блокировка Hhex в гепатоцитах должна привести к аналогичному эффекту: уменьшению или прекращению жировой трансформации гепатоцитов *in vivo*. Поэтому мы решили обратиться к более доступной для нас модели — модели стеатоза у мышей. В рамках этой модели мы планировали изучить роль Hhex за счёт его подавления в гепатоцитах с помощью липосом, нагруженные микроРНК к Hhex.

Для проверки этой гипотезы мы воспользовались линией мышей ApoE^{-/-}, которые склонны к быстрому (в течение 4 недель) развитию стеатоза на фоне применения высококалорийной диеты. Поскольку нам было важно смоделировать накопление жира до развития воспаления, мы решили сократить сроки содержания

мышей ApoE^{-/-} на корме с повышенным содержанием холестерина до двух недель. И, действительно, двух недель оказалось вполне достаточно для развития стеатоза.

На небольших группах животных мы определили однократную эффективную дозу препарата микроРНК к Hhex+липосомы для использования *in vivo*, которая составила 0,5 мг/кг. При использовании однократной дозы 1 мг/кг отмечалось неспецифическое подавление Hhex и в контроле.

Далее мы изучали влияние Hhex на накопление жировых вакуолей в печени. Мы сформировали контрольную и экспериментальную группы животных по 10 мышей в каждой и обозначили их как H2 (микроРНК Hhex 2, наиболее эффективно подавляющая Hhex) и luc (контрольная микроРНК) соответственно. Мышам вводили препарат (липосомы + микроРНК к Hhex 2 и липосомы + микроРНК контрольная, соответственно), через неделю препарат вводили ещё раз и животных переводили на корм Western Type diet (Western Type diet 21% жира, 0,15% холестерина и 19,5% казеина, производитель Altromin), ещё через неделю введение повторяли, при этом животные продолжали получать Western Type diet. В конце этой недели эксперимент прекращали, животных выводили. Печень забирали для проведения анализа. Таким образом, эксперимент продолжался 3 недели, из которых 2 последние недели животные получали специализированный корм, препарат животным вводился трижды, в начале каждой экспериментальной недели. По окончании эксперимента печени замораживали в Tissue Tec для последующего гистологического исследования.

На криосрезах печени окрашенных Oil Red O заметно снижение выраженности накопления липидных гранул в группе животных с подавленным Hhex по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, нам удалось на разных моделях, *in vitro* и *in vivo*, продемонстрировать закономерность влияния Hhex: подавление Hhex приводит к подавлению накопления жировых вакуолей в клетках печени, преадипоцитах мыши и человека.

Список литературы

1. Pan X., Wang P., Luo J., et al. Adipogenic changes of hepatocytes in a high-fat diet-induced fatty liver mice model and non-alcoholic fatty liver disease patients // *Endocrine*. 2015. Vol. 48, N 3. P. 834–847. doi: 10.1007/s12020-014-0384-x
2. Lee D. The role of CREB in the liver and adipose tissue [dissertation]. 2014. 116 p.
3. Evseeva M.N., Balashova M.S., Kulebyakin K.Y., Rubtsov Y.P. Adipocyte biology from the perspective of *in vivo* research: review of key transcription factors // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 1. ID 322. doi: 10.3390/ijms23010322
4. Evseeva M.N., Dyikanov D.T., Karagyaur M.N., et al. Hematopoietically-expressed homeobox protein HHEX regulates adipogenesis in preadipocytes // *Biochimie*. 2021. Vol. 185. P. 68-77. doi: 10.1016/j.biochi.2021.02.011
5. Evseeva M.N., Karagyaur M.N., Dyikanov D.T., et al. Homeobox transcription factor Hhex regulates adipogenesis in human AT-MSCs // *J Food Nutr Disor*. 2021. Vol. 10.

Егорова А.А.✉, Манжуло И.В., Ивашкевич Д.Н., Пономаренко А.И.

Этаноламид стеариноновой кислоты модулирует процесс нейровоспаления при легкой черепно-мозговой травме у мышей

ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ egoraeva.nastya@gmail.com

Аннотация. Нейровоспаление — основной компонент патофизиологии неврологических и нейродегенеративных заболеваний, представляющий потенциальную терапевтическую мишень. В исследовании охарактеризовано новое соединение липидной природы, проявляющее противовоспалительную активность при травме центральной нервной системы).

Ключевые слова: легкая черепно-мозговая травма; нейровоспаление; этаноламид стеариноновой кислоты; церебролизин; микроглия.

Egoraeva A.A., Manzhulo I.V., Ivashkevich D.N., Ponomarenko A.I.

Stearidonic acid ethanolamide modulates neuroinflammation in mild traumatic brain injury in mice

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. Neuroinflammation is a major component of the pathophysiology of neurological and neurodegenerative diseases which represents a potential therapeutic target. The study characterizes a novel lipid compound that exhibits anti-inflammatory activity in central nervous system trauma.

Keywords: mild traumatic brain injury; neuroinflammation; stearidonic acid ethanolamide; cerebrolysin; microglia.

Черепно-мозговые травмы различной этиологии являются одной из основных причин смертности и инвалидизации населения во всем мире, ежегодно от них страдает около 70 млн людей. При этом легкие черепно-мозговые травмы (лЧМТ) составляют более 80% от всех случаев ЧМТ. Легкая ЧМТ является гетерогенным заболеванием, долгосрочные последствия которого зависят от типа и тяжести первоначального физического воздействия, и усугубляется вторичными патофизиологическими процессами. Пациенты, перенесшие лЧМТ, могут испытывать долгосрочные когнитивные нарушения, сопровождающиеся развитием нейродегенеративных заболеваний, депрессии и дефицита памяти [1]. Вероятно, это связано с рядом вторичных повреждений, таких как нейрональная дисфункция, дендритные/синаптические нарушения, реактивность астроцитов, лейкоцитарная инфильтрация, аксональная дегенерация, гибель клеток и нейровоспаление. Несмотря на высокую распространенность и долгосрочные последствия лЧМТ, на сегодняшний день не существует эффективных терапевтических стратегий, для скорейшего восстановления или смягчения посттравматических последствий. Поэтому необходим поиск и разработка новых лекарственных средств, направленных на комплексную терапию данного заболевания. В связи с этим, перспективными соединениями являются вещества липидной природы — этаноламиды полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК). Они в несколько десятков раз по эффективности превосходят омега-3 ПНЖК, проявляя противовоспалительную активность, усиливая выработку нейротрофинов и антиоксидантных ферментов [2]. Поэтому в нашей работе впервые был исследован этаноламид стеариноновой кислоты (ЭСК) для оценки его терапевтического потенциала при терапии лЧМТ. Наш эксперимент длился 2.5 месяца на самцах мышей линии C57BL/6. Животные были разделены на 5 групп: «Контроль», «Контроль+ЭСК», «лЧМТ», «лЧМТ+ЭСК» и «лЧМТ+Церебролизин». Для моделирования закрытой лЧМТ применялась модель свободного падения

груза на череп мыши. Этаноламид стеариновой кислоты был получен из пищеварительной железы кальмара *Berryteuthis magister* по методу разработанному в лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН [3]. Этаноламид стеариновой кислоты (10 мг/кг) и препарат сравнения церебролизин (43 мг/кг) вводили подкожно за 2 дня до травмы и в течение 8 суток после операции. Микроглиальную активность в гиппокампе оценивали с помощью иммуногистохимического маркера к *iba-1*. Дополнительно, был проведен вестерн-блот анализ уровня провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) и белка постсинаптической плотности 95 (PSD-95) в гиппокампе экспериментальных животных. Известно, что в интактной ЦНС микроглия имеет небольшое тело и тонкие, разветвленные отростки. При нарушении гомеостаза мозга, происходит активация микроглии сопровождающаяся быстрыми изменениями в форме клеток и функциональном состоянии. В нашей работе с помощью иммуногистохимического окрашивания на *iba-1* установлено, что микроглиальная активность повышалась в группе «лЧМТ» относительно контроля почти в 2 раза. В тоже время, введение ЭСК уменьшало количество *iba-1*-позитивных клеток почти до уровня контроля. Применение церебролизина не оказывало влияния на уменьшение микроглиальной активности, оставляя ее на уровне группы «лЧМТ». По данным анализа методом вестерн-блот, в группе «лЧМТ» провоспалительные цитокины (ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО α) повышались относительно группы «Контроль». Применение ЭСК способствовало уменьшению их уровня выработки практически до контрольных значений. В тоже время, церебролизин снижал выработку ИЛ-6 и ФНО α , но не ИЛ-1 β . Белок PSD-95 является основным синаптическим строительным белком из класса мембрано-ассоциированной гуанилаткиназы (MAGUK). PSD-95 — важный компонент, участвующий в глутаматергической передаче, синаптической пластичности и морфогенезе дендритных шипиков. Геномные исследования связывают дисфункцию PSD-95 с нейropsychиатрическими расстройствами и нейродегенеративными заболеваниями [4]. Исходя из наших данных, полученных в ходе эксперимента, мы предполагаем, что лЧМТ приводит к нейровоспалению, которое сопровождается повреждением и гибелью нейронов и, тем самым, уменьшается количество PSD-95. Применение ЭСК оказывает нейропротекторное действие за счет снижения процесса нейровоспаления, что способствует восстановлению уровня выработки PSD-95 до контрольных значений. Применение церебролизина приводило к увеличению продукции PSD-95, по сравнению с группой «лЧМТ», но в меньшей степени, чем в группе «лЧМТ+ЭСК». Таким образом, ЭСК является перспективным соединением для терапевтической коррекции последствий лЧМТ, способствуя уменьшению микроглиальной активности и продукции провоспалительных цитокинов, тем самым оказывая выраженное нейропротекторное действие.

Список литературы

1. Girgis F., Pace J., Sweet J., Miller J.P. Hippocampal neurophysiologic changes after mild traumatic brain injury and potential neuromodulation treatment approaches // *Front Syst Neurosci*. 2016. Vol. 10. ID 8. doi: 10.3389/fnsys.2016.00008
2. Tyrtysnaia A., Konovalova S., Ponomarenko A., et al. Fatty acid-derived N-acyl ethanolamines dietary supplementation attenuates neuroinflammation and cognitive impairment in LPS murine model // *Nutrients*. 2022. Vol. 14, N 18. ID 3879. doi: 10.3390/nu14183879
3. Latyshev N.A., Ermolenko E.V., Kasyanov S.P. Concentration and purification of polyunsaturated fatty acids from squid liver processing wastes // *Eur J Lipid Sci Technol*. 2014. Vol. 116, N 11. P. 1608–1613. doi: 10.1002/ejlt.201400083
4. Wu Q., Sun M., Bernard L.P., Zhang H. Postsynaptic density 95 (PSD-95) serine 561 phosphorylation regulates a conformational switch and bidirectional dendritic spine structural plasticity // *J Biol Chem*. 2017. Vol. 292, N 39. P. 16150–16160. doi: 10.1074/jbc.M117.782490

Егорихина М.Н. ✉, Тимофеева Л.Б., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Линькова Д.Д., Фарафонтова Е.А., Рябков М.Г., Алейник Д.Я.

Восстановление кожного покрова при применении оригинального эквивалента кожи — доклинические исследования

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

✉ egorihina.marfa@yandex.ru

Аннотация. В работе представлены результаты доклинических исследований эффективности оригинального эквивалента кожи на основе биополимерного скаффолда-носителя с инкапсулированными мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани. Исследования проведены на модели крупного лабораторного животного (свиньи).

Ключевые слова: эквивалент кожи; скаффолд; мезенхимальные стволовые клетки; доклинические исследования; кожа; регенерация.

Egorikhina M.N., Timofeeva L.B., Rubtsova Yu.P., Charykova I.N., Linkova D.D., Farafontova E.A., Ryabkov M.G., Aleynik D.Ya.

Skin regeneration with original skin equivalent — preclinical studies

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. The paper presents the results of preclinical studies of the effectiveness of the original skin equivalent based on a biopolymer scaffold carrier with encapsulated mesenchymal stem cells of adipose tissue. The studies were conducted on a large laboratory animal model (pig).

Keywords: skin equivalent; scaffold; mesenchymal stem cells; preclinical studies; skin; regeneration.

Кожа является самым большим органом в организме человека и играет ключевую роль в таких жизненно важных процессах, как гидратация, защита от химических веществ и патогенов, инициализация синтеза витамина D, выделение и терморегуляция. Поэтому серьезные повреждения кожи могут быть опасны для жизни. Восстановление дефектов кожного покрова при различных повреждениях, таких как обширные ожоги, длительно не заживающие язвы, обширные механические раневые повреждения и пр., является актуальной проблемой во всем мире. Терапия кожных ран может быть классифицирована как «традиционная» и «регенеративная». Обычная (традиционная) терапия часто приводит к образованию рубцов. Регенеративная терапия ран — это новое и быстро развивающееся направление биомедицины, направленное на восстановление кожи до ее изначальной структуры и функции, без образования рубцов. Общемировым трендом для решения этой задачи является использование клеточных технологий и продуктов тканевой инженерии.

В ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России разработан тканеинженерный конструкт — эквивалент кожи (ЭК) на основе биополимерного скаффолда-носителя с инкапсулированными мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани (Пат. № 2653434 РФ от 11.04.2017). На этапах доклинических исследований *in vitro* было показано, что скаффолд способен выступать в качестве искусственной клеточной ниши и обеспечивать не только поддержание функциональной активности МСК, но и процессы сходные с естественными процессами «динамической взаимности». При проведении исследований биосовместимости *in vivo* согласно ISO 10993-6-2021 было показано, что при имплантации в ткани животного (крысы) происходит полное замещение ЭК компонентами соединительной ткани, подтверждено отсутствие острого воспалительного

процесса. Сравнительное исследование регенеративного потенциала ЭК на модели полнослойной скальпированной раны у крыс показало, что ЭК способствует раннему интенсивному развитию ангиогенеза и созреванию грануляционной ткани на ранних сроках развития регенеративного процесса и формированию тканей сопоставимых со здоровыми тканями на поздних сроках. Результаты этих исследований позволили перейти к исследованиям на крупных лабораторных животных.

Исследование проведено на 8 свиньях на модели полнослойной скальпированной раны с использованием модельного эквивалента, согласующегося со стратегией «гомологичный препарат». Животным формировали 6 полнослойных скальпированных ран: 2 — контрольные, 2 — имплантация в область дефекта ЭК, 2 — имплантация в область дефекта бесклеточного скаффолда-носителя. Вывод животных из эксперимента и гистологическое исследование проводили на 7-е и 42-е сутки. Было установлено, что на 7-е сутки эксперимента в обоих видах опытных ран процесс заживления протекал интенсивнее, чем в контрольных ранах. Созревание грануляционной ткани в ранах с бесклеточным скаффолдом протекало быстрее, чем с ЭК.

На 42 сутки во всех экспериментальных ранах можно было выделить три области: восстановленная дерма — соответствовала строению дермы интактной кожи; зона ремоделирования — характеризовалась появлением разнонаправленных пучков коллагеновых волокон и присутствием активных фибробластов; грануляционная ткань. В контрольных ранах формировалась рубцовая ткань, отличающаяся толстыми горизонтальными коллагеновыми волокнами, между которыми располагались горизонтально ориентированные фибробласты с узким длинным ядром и слабо развитой цитоплазмой. В опытных ранах с бесклеточным скаффолдом интенсивно протекал процесс синтеза коллагена. Так, во всей области раны присутствовали крупные фибробласты, матрикс между ними выглядел однородным, поскольку коллагеновые волокна находились на стадии формирования. На границе с окружающей дермой протекал процесс реорганизации грануляционной ткани, фактически здесь можно было наблюдать сформированную соединительную ткань. В раневых дефектах с имплантированным ЭК процесс ремоделирования грануляционной ткани затрагивал всю область раны. Созревающие коллагеновые волокна наблюдались по всей толщине регенерата, при этом они образовывали разнонаправленные пучки, что соответствовало гистологическому строению дермы кожи в норме. В целом активность фибробластов снижалась, однако сохранялись небольшие участки с признаками активного коллагеногенеза. Использование скаффолда и ЭК ускоряло процесс созревания соединительной ткани в области раны по сравнению с контролем. При этом ремоделирование соединительной ткани регенерата при применении ЭК происходило быстрее, чем при использовании скаффолда. Полученные данные позволяют предполагать, что представленный конструкт может стать эффективным инструментом регенеративной медицины и использоваться для восстановления повреждений кожи.

Егоров В.С.^{1,2} ✉, Филимонов А.Ю.¹, Чудных С.М.^{1–3}, Абдувосидов Х.А.^{1,3,4}, Чекмарева И.А.^{5,6},
Паклина О.В.^{1,5}, Баранчугова Л.М.⁴

Морфологическая характеристика регенерации инфицированных ран при воздействии высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения

¹ ГБУЗ Московский клинический научно-практический центр им. А.С. Логинова ДЗМ, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет Минздрава России, Тверь, Россия

⁴ ФГБОУ ВО Российский биотехнологический университет, Москва, Россия

⁵ ФГБУ НИИЦ хирургии им. А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

⁶ ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

✉ yegoroff84@mail.ru

Аннотация. В хирургии широко применяются методы фототерапии, такие как лазерное и ультрафиолетовое облучение тканей. В эксперименте изучена эффективность высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения при лечении инфицированных ран с помощью морфологических методов исследования.

Ключевые слова: инфицированные раны; раневой процесс; высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение; ультрафиолетовое облучение.

Egorov V.S.^{1,2}, Filimonov A.Yu.¹, Chudnykh S.M.^{1–3}, Abduvosidov Kh.A.^{1,3,4}, Chekmareva I.A.^{5,6},
Paklina O.V.^{1,5}, Baranchugova L.M.⁴

Morphological characteristics of infected wound regeneration under impact of high-intensity pulsed broadband irradiation

¹ Moscow Clinical Scientific Center n.a. A.S. Loginov, Moscow, Russia

² FSBEI HE «Russian University of Medicine» of MOH of Russia, Moscow, Russia

³ FSBEI HE «Tver State Medical University» of MOH of Russia, Tver, Russia

⁴ FSBEI HE «Russian Biotechnological University», Moscow, Russia

⁵ National Medical Research Center for Surgery named after A.V. Vishnevsky, Moscow, Russia

⁶ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Phototherapy methods such as laser and ultraviolet irradiation of tissues are widely used in surgery. The effectiveness of high-intensity pulsed broadband irradiation in the treatment of infected wounds was studied experimentally using morphological research methods.

Keywords: infected wounds; wound process; high-intensity pulsed broadband irradiation; ultraviolet irradiation.

В связи с высокой лекарственной устойчивостью микроорганизмов некоторые авторы предлагают искать альтернативные пути лечения инфицированных ран с применением физических методов воздействия [1, 2]. Так в хирургии широко применяются методы фототерапии, которые включают в себя, в том числе, лазерное и ультрафиолетовое облучение тканей. В настоящее время в литературных источниках имеется много работ, посвященных клинической, бактерицидной и иммунологической эффективности применения различных методов фототерапии, при этом редко встречаются исследования, где подробно описаны морфологические основы эффективности их применения, в том числе и ультрафиолетового облучения [3–5].

Целью исследования явилось изучение эффективности высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения при лечении инфицированных ран с помощью морфологических методов исследования.

Проведено морфологическое исследование препаратов ран 105 крыс-самцов линии Vistar, которым в эксперименте моделировали инфицированные раны смесью культур *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Исследование было одобрено Межвузовским комитетом по этике (выписка из протокола № 06-23 от 15.06.23) и проведено в условиях вивария ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России. Выделено три группы животных. В первой группе местное лечение ран дополняли высокоинтенсивным импульсным широкополосным облучением, во второй группе — традиционным ультрафиолетовым облучением, и в третьей местно применяли только антисептик. Контроль выполнялся до лечения, на 7, 14 и 21-е сутки лечения. Для статистического анализа использованы непараметрические методы статистики. Проведенное нами экспериментальное исследование лечения инфицированных ран показало, что до начала лечения морфологическая картина ран соответствовала фазе острого воспаления.

На седьмой день лечения выявлено, что в группе животных, которым применялось высокоинтенсивное импульсное широкополосное облучение, в препаратах ран имело место уменьшение нейтрофильной и лимфацитарной инфильтрации по сравнению с предыдущим сроком контроля и по сравнению с другими группами. Также отмечалось появление юных фибробластов и увеличение количества макрофагов, базофилов и плазмочитов по сравнению с группами контроля, что указывало на более раннюю активацию иммунокомпетентных клеток и начало ремоделирования соединительной ткани в ответ на проводимую терапию. Во второй и третьей группе животных отек и инфильтрация тканей в ране к седьмому дню лечения сохранялась. Хотя в препаратах ран второй группы животных, которым для лечения использовали традиционное ультрафиолетовое облучение, тоже, как и в первой группе, появлялись юные фибробласты, что указывало на начало регенеративного процесса.

К четырнадцатому дню лечения в первой и второй группе нами отмечена положительная динамика, как в качественной, так и в количественной морфологической характеристике ран. В группе, где раны облучались высокоинтенсивным импульсным широкополосным излучением, в препаратах признаков инфильтрации практически не было, отмечалось большое количество клеток соединительной ткани и формирование новых коллагеновых волокон, имело место появление новых сосудов, указывающее на начало формирования грануляционной ткани и переход ран в стадию регенерации. Во второй группе уменьшалась инфильтрация, на фоне чего снижалось количество нейтрофилов и лимфоцитов, появлялись новые капилляры, увеличивалось количество фибробластов. В третьей группе, где лечение ран проводилось только при помощи антисептика, воспалительные явления в препаратах ран сохранялись без признаков начала ремоделирования соединительной ткани.

На фоне лечения к двадцать первому дню в препаратах ран первой группы признаки воспаления отсутствовали на фоне чего наблюдалось ремоделирование соединительной ткани с признаками образования нежного рубца. Во второй группе животных признаки инфильтрации минимальны, наблюдались явления ремоделирования соединительной ткани, в которой присутствовали новые капилляры. В препаратах ран третьей группы животных инфильтрация уменьшена, новые сосуды образуются с замедлением.

Таким образом, морфологическое исследование показало, что использование высокоинтенсивного импульсного широкополосного облучения инфицированных ран в отличии от традиционного ультрафиолетового облучения и лечения ран антисептиками в более ранние сроки купирует воспалительную реакцию тканей, активизирует местную иммунную реакцию и ускоряет процессы ремоделирования соединительной ткани.

Список литературы

1. Alcolea J.M., Hernández E., Martínez-Carpio P.A, et al. Treatment of chronic lower extremity ulcers with a new er: Yag laser technology // *Laser Ther.* 2017. Vol. 26, N 3. P. 211–222. doi:10.5978/islsm.17-OR-17
2. Aleksandrowicz H., Owczarczyk-Saczonek A., Placek W. Venous leg ulcers: Advanced therapies and new technologies // *Biomedicines.* 2021. Vol. 9, N 11. ID 1569. doi: 10.3390/biomedicines9111569

3. Wang D., Kuzma M.L., Tan X., et al. Phototherapy and optical waveguides for the treatment of infection // *Adv Drug Deliv Rev.* 2021. Vol. 179. ID 114036. doi: 10.1016/j.addr.2021.114036
4. Архипов В.П., Багров В.В., Бяловский Ю.Ю., и др. Организация доклинических исследований бактерицидного и ранозаживляющего действия импульсного фототерапевтического аппарата "Заря" // *Проблемы социальной гигиены, здравоохранения и истории медицины.* 2021. Т. 29, № 5. С. 1156–1162. EDN: FBFVYZ doi: 10.32687/0869-866X-2021-29-5-1156-1162
5. Rhea L., Dunnwald M. Murine excisional wound healing model and histological morphometric wound analysis // *J Vis Exp.* 2020. N 162. ID e61616. doi: 10.3791/61616

Ельчанинов А.В.^{1,2} ✉, Вишнякова П.А.^{2,3}, Фатхудинов Т.Х.^{1,3}

Репаративная регенерация селезенки после аутологичной трансплантации под кожу

- ¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия
- ² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия
- ³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, Россия

✉ elchandrey@yandex.ru

Аннотация. В работе представлены данные о регенерации селезенки млекопитающих при аутологичной трансплантации под кожу у мыши. Восстановление структуры органа, популяции макрофагов, мегакариоцитов и В-лимфоцитов завершается к 30-м суткам после трансплантации. Источником восстановления являются клетки реципиента.

Ключевые слова: селезенка; трансплантация; регенерация; мегакариоциты; макрофаги; лимфоциты.

Elchaninov A.V.^{1,2}, Vishnyakova P.A.^{2,3}, Fatkhudinov T.Kh.^{1,3}

Reparative regeneration of spleen after autologous transplantation under the skin

- ¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia
- ² National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology Named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia
- ³ Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Abstract. Data on the regeneration of mammalian spleen at autologous transplantation under the skin in the mouse are presented in the paper. The restoration of the organ structure, population of macrophages, megakaryocytes and B-lymphocytes is completed by 30 days after transplantation. The source of recovery is the recipient's cells.

Keywords: spleen; transplantation; regeneration; megakaryocytes; macrophages; lymphocytes.

Удаление селезенки часто к развитию постспленэктомического синдрома [1]. Одним из возможных решением данной проблемы является гетеротопическая аутоаутологичная трансплантация селезенки. Известно, что после такой операции у модельных животных происходит быстрое восстановление обычной структуры селезенки в трансплантатах [2–4]. Однако неясно, насколько регенерировавший трансплантат функционально полноценен с точки зрения восстановления лимфо- и гемапоэтической функции. Целью данной работы было установить динамику восстановления популяции В и Т-лимфоцитов, моноцитарно-макрофагальной системы, а также мегакариоцитопоэза.

Воспроизведена модель гетеротопической аутоаутологичной трансплантации под кожу селезенки у самцов мышей C57Bl. Для изучения клеточных источников регенерации воспроизведена модель гетеротопической трансплантации селезенки от самцов B10 GFP мышей самцам C57Bl. Динамика клеточного состава изучена методами иммуногистохимии и проточной цитометрии. Экспрессия регуляторных генов и содержание ответствующих белков была оценена методами ПЦР-РВ и вестерн-блоттинга.

Установлено, что характерная структура селезенки восстанавливается в трансплантатах в течение 30 суток, что согласуется с другими исследованиями. При этом быстрее восстанавливаются популяции клеток моноцитарно-макрофагальной системы, мегакариоцитов, а также В-лимфоцитов. Для восстановления популяции Т-лимфоцитов требуется большее время, отмечено, что даже через 30 суток после трансплантации количество мало дифференцированных Т-лимфоцитов CD4CD8 значимо выше, чем в интактной селезенке. С помощью трансплантации селезенки от B10GFP мышей нами показано, что источником восстановления клеточного состава трансплантатов селезенки является организм-реципиента, так как количество GFP⁺ клеток в регенерате было около 1%. При трансплантации скеффолда с заселением стромальными клетками селезенки и без него восстановление характерной структуры селезенки не происходит.

При аллогенной трансплантации под кожу фрагментов селезенки происходит регенерация ее структуры в течение 30 суток. Наиболее быстро восстанавливается популяция моноцитарно-макрофагальной системы, мегакариоцитов и В-лимфоцитов, для восстановления популяции Т-лимфоцитов требуется большее время. Источником восстановления клеточного состава трансплантатов являются, вероятно, циркулирующие гемопоэтические клетки.

Список литературы

1. Buzelé R., Barbier L., Sauvanet A., Fantin B. Medical complications following splenectomy // *J Visc Surg*. 2016. Vol. 153, N 4. P. 277–286. doi: 10.1016/J.JVISCURG.2016.04.013
2. Dijkstra C.D., Langevoort H.L. Regeneration of splenic tissue after autologous subcutaneous implantation: Development of non-lymphoid cells in the white pulp of the rat spleen // *Cell Tissue Res*. 1982. Vol. 222. P. 69–79. doi: 10.1007/BF00218289
3. Calder R.M., Scholar G. Autoplastic splenic grafts: Their use in the study of the growth of splenic tissue // *J Pathol Bacteriol*. 1939. Vol. 49, N 2. P. 351–362. doi: 10.1002/PATH.1700490209
4. Braga A.A., Malagó R., Anacleto T.P., et al. Histological aspects of autologous transplantation of different fragments of the spleen in rats // *Acta Cir Bras*. 2012. Vol. 27, N 12. P. 880–884. doi: 10.1590/S0102-86502012001200009

Енукашвили Н.И.¹⁻³ ✉, Пономарцев Н.В.¹, Соловьева А.И.¹, Гуца Е.А.¹, Белик Л.А.¹, Волков В.В.¹

Роль некодирующих РНК в канцерогенезе и формировании опухолевого микроокружения

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, Россия

✉ n.enukashvily@incras.ru

Аннотация. Некодирующие РНК составляют до 80% транскриптома. В докладе рассмотрены собственные и литературные данные о роли РНК tandemных и диспергированных повторов в онкотрансформации клеток и формировании опухолевой ниши, в частности в строме опухоли.

Ключевые слова: длинные некодирующие РНК; tandemноповторяющаяся ДНК; диспергированные повторы; транспозоны; опухоль-ассоциированные фибробласты; опухолевая ниша; аденокарцинома легкого; множественная миелома.

Enukashvily N.I.¹⁻³, Ponomartsev N.V.¹, Solovyova A.I.¹, Gushcha E.A.¹, Belik L.A.¹, Volkov V.V.¹

Role of non-coding RNAs in carcinogenesis and tumorigenesis

¹ Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

³ Cell Technologies Center «Pokrovsky», Saint Petersburg, Russia

Abstract. Non-coding RNAs comprise up to 80% of the transcriptome. Our own and previously published data on the role of tandem and dispersed RNA repeats in cell oncotransformation and tumor niche formation, particularly in the tumor stroma, will be discussed.

Keywords: long non-coding RNAs; tandemly repeated RNA; dispersed repeats; transposons; cancer-associated fibroblasts; tumor niche; lung adenocarcinoma; multiple myeloma.

В свете последних исследований в области клинической онкологии, молекулярной и клеточной биологии, очевидно, что потенциально эффективным является подход, при котором лечение направлено одновременно и против собственно опухолевых клеток, и против клеток стромы опухоли, т.е. микроокружения опухоли, включающего в себя опухолевые фибробласты, клетки сосудов и клетки иммунной системы. Для этого необходимо исследовать механизмы коммуникации (cross-talk) между клетками опухоли и стромы. Изучение этих механизмов дает возможность создавать, новые методы и препараты, воздействующие одновременно или селективно на опухолевые клетки и стромальные компоненты опухоли. Геном человека на 98% представлен повторяющимися последовательностями, одни из которых разбросаны по геному (диспергированные повторы, транспозоны, ТЕ), а другие располагаются кластерами (tandemные повторы, сателлитная ДНК). Для разработки новых подходов противоопухолевой терапии необходима разработка новых методов, направленных на выявление и, при необходимости компенсации изменений в этой области генома. Некодирующая ДНК является участком формирования генетической нестабильности. Известно, что в малигнизации клеток и формировании опухоли значительную роль играют некодирующие ДНК как источник генетической нестабильности. Однако, показано, что во многих опухолях наблюдается многократное увеличение транскрипционной активности tandemных и диспергированных повторов. Цель исследования: оценить уровень экспрессии и физиологическую роль tandemных и диспергированных повторов в канцерогенезе на примере солидной опухоли, аденокарциномы легкого, и гематологического

новообразования — множественной миеломы. На первом этапе был проведен анализ опубликованных bulk транскриптомов данных опухолей. Показано увеличение транскрипции прицентромерных и центромерных tandemных повторов, а также некоторых LTR/ERV, L1 последовательностей. При анализе транскриптомов одиночных клеток выявлены различия в составе транскрибируемого репитома (набора повторяющихся последовательностей) между различными кластерами клеток. Выявлены последовательности прицентромерной tandemноповторяющейся РНК сателлита 2/3 (HS2/3), селективно транскрибируемые в опухоль-ассоциированной строме аденокарциномы и опухолевой гемопэтической нише. Их транскрипция в фибробластах стромы аденокарциномы индуцировалась TGF- β , IL1 α , а также присутствием опухолевых клеток, выращиванием на матриксах высокой жесткости и обработкой цитостатиками. Транскрипты выявлены в ядре и цитоплазме, а также во внеклеточном пространстве. Опухолевые клетки и опухоль-ассоциированные фибробласты способны к интернализации транскриптов из внеклеточного пространства. Инактивация выявленных транскриптов HS2/3 приводила к снижению выраженности сенесцентного проинфламаторного фенотипа фибробластов. При сокультивировании фибробластов с опухолевыми клетками аденокарциномы в последних также наблюдали повышение уровня транскрипции HS2/3. Трансфекция конструкцией, избыточно экспрессирующей HS2/3, или индукция экспрессии HS2/3 в опухолевых клетках приводила к активации эпителиально-мезенхимного перехода (ЭМТ) в клетках аденокарциномы. При инактивации же экспрессии, напротив, снижался уровень экспрессии генов-маркеров ЭМТ. Обработка антисмысловыми конструкциями клеток аденокарциномы (A549) перед инъекциями иммунодефицитным мышам приводила к снижению размеров опухоли. Проведенные исследования подтверждают роль tandemных и диспергированных повторов в формировании опухоли.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2021-1075).

Еремеев А.В.✉, Голубинская П.А., Пикина А.С., Ручко Е.С.

Исследование биораспределения препарата тканевой инженерии на основе дифференцированных в хондроциты ИПСК при имплантации иммунодефицитным мышам

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

✉ art-eremeev@yandex.ru

Аннотация. Работа направлена на изучение биораспределения препарата тканевой инженерии на основе хондроцитов, полученных из дифференцированных производных ИПСК и хондроцитов донорского материала с помощью ПЦР. Кроме этого, в работе показаны результаты гистологического анализа состоятельности имплантатов, полученных из клеток различного происхождения, введенных мышам линии Balb/c Nude. Показано отсутствие миграции клеток за пределы зоны имплантации, при сохранении гистологической структуры тканеинженерной 3D-конструкции близкой к нативному хрящу. Данный имплантат в виде хондросфер предназначен для лечения поражений суставного гиалинового хряща человека.

Ключевые слова: ИПСК; хондроциты; дифференцировка; тканевая инженерия; имплантат; хондросферы.

Eremeev A.V., Golubinskaya P.A., Pikina A.S., Ruchko E.S.

Investigation of the bio-distribution of a tissue engineering products based on iPSCs differentiated into chondrocytes for implantation in immunodeficient mice

Lopukhin FRCC PCM, Moscow, Russia

Abstract. The work is aimed at studying the bio-distribution of a tissue engineering drug based on chondrocytes obtained from differentiated derivatives of iPSCs and chondrocytes of donor material using PCR. In addition, the work shows the results of histological analysis of the viability of implants obtained from cells of various origins injected into Balb/c Nude mice. The absence of cell migration outside the implantation zone was shown, while maintaining the histological structure of the 3D tissue engineering structure close to the native cartilage. This implant in the form of Chondro spheres is designed to treat lesions of human articular hyaline cartilage.

Keywords: iPSC; chondrocytes; differentiation; tissue engineering; implant; chondrospheres.

К текущему моменту в России отсутствуют технологии, направленные на патогенетическое лечение повреждений ткани суставного хряща. Основным терапевтическим подходом являются противовоспалительные средства, препараты гиалуроновой кислоты и аутологичной тромбоцитарной массы, которые снимают симптомы и дают небольшую отсрочку для эндопротезирования. Использование 3D-хрящеподобных конструкторов из хондроцитов и ИПСК-производных является перспективным направлением для коррекции глубоких дефектов хрящевой ткани. В рамках доклинических исследований подобных препаратов тканевой инженерии (ПТИ) должны быть оценены биораспределение, характеризующее миграционный потенциал клеток, а также способность образовывать эктопическую хрящевую ткань [1, 2].

Цель данной работы: изучение биораспределения с оценкой состоятельности имплантата с помощью гистологического анализа. Данный имплантат в виде хондросфер предназначен для лечения поражений суставного гиалинового хряща человека.

Мышей линии Balb/c Nude обоих полов разделили на две опытные группы (инокуляция хондросфер из хондроцитов человека, из производных ИПСК, дифференцированных в хондрогенном направлении)

и контрольную группу (плацебо). Мышей взвешивали дважды в неделю, значимых различий по весу животных выявлено не было. Каждые 10 дней проводили измерение размеров инокулята — хондросферы из ИПСК-производных образовывали меньшие по объёму инокуляты. Через 90 дней из эксперимента вывели половину особей контрольной группы, с инокулированными подкожно Хондросферами на основе хондроцитов человека и из дифференцированных производных ИПСК. Из органов и тканей животных выделяли ДНК с последующим проведением ПЦР анализа на наличие человеческой ДНК, которая была обнаружена только у мышей в месте закола хондросфер. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии миграции клеток изучаемого ПТИ в другие органы и ткани животных. Гистологическое исследование введенных Хондросфер проводили с помощью окраски гематоксилином и эозином, альциановым синим, трихромом по Маллори и антителами к коллагену I и II типов, агрекану, SOX9, Ki67. Во всех образцах имплантов были выявлены все указанные маркеры хрящевой ткани.

Кроме этого были исследованы в данной работе транскриптомные (RNA-seq) и протеомные (LC-MS) профили клеточных культур хондроцитов, выделенных из биоптатов как здоровых доноров, так и пациентов с различными вариантами патологий, а также их 3D-клеточных культур — в виде сфероидов. Аналогичные профили были получены для 2D- и 3D-культур ИПСК и дифференцированных из ИПСК хондроцитоподобных производных. Оценка содержания гликозаминогликанов (ГАГ) в указанных культурах проводилась методом ИФА. По результатам ИФА наиболее высокие концентрации ГАГ обнаружены в образцах 3D-структур из хондроцитов пациентов. По данным протеомного анализа основные отличия выявлены между культурами хондроцитов пациентов и дифференцированных производных ИПСК. При этом повышенную экспрессию основных протеогликанов — агрекана, декорина, бигликана и хондроитинсульфата — показали образцы хондросфер из хондроцитов донорского материала. При сравнении 2D-культур хондроцитов от здоровых и больных доноров была выявлена *up*-регуляция генов, ассоциированных с синтезом и организацией ВКМ. Для сфероидов из хондроцитов пациентов, в отличие от сфероидов из производных ИПСК, характерна повышенная экспрессия генов, вовлеченных в формирование ВКМ и метаболизм ГАГ. Как и при сравнении сфероидов, в хондроцитах от пациентов была выявлена повышенная экспрессия генов, отвечающих за метаболизм и организацию внеклеточных структур. При этом наблюдалась пониженная экспрессия генов, вовлеченных в регуляцию пролиферации клеток. При сравнении хондроцитоподобных производных ИПСК с ИПСК было выявлено обогащение путей, вовлеченных в синтез коллагена. При сравнении 2D- и 3D-культур нативных хондроцитов выявлено увеличение экспрессии генов, регулирующих цикл ГТФаз и снижение экспрессии генов, вовлеченных в метаболизм глюкозы и углеводов. Для хондроцитов, полученных из биоптатов от пациентов с артрозами, характерна активность генов, регулирующих клеточный цикл и генов, участвующих в организации ВКМ, синтез и деградацию коллагена. Все это свидетельствует о том, что хондрогенез с участием ИПСК производных аналогичен процессам, протекающим в ювенильном хряще.

Проведённое исследование даёт основания оценивать исследуемые образцы ПТИ как безопасные по части биораспределения. При этом интеграция продукта происходит на ранних сроках исследования (90 дней) с сохранением гистологических характеристик хрящевой ткани в зоне имплантации.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-15-00250.

Список литературы

1. Erben R.G., Silva-Lima B., Reischl I., et al. White paper on how to go forward with cell-based advanced therapies in Europe // *Tissue Eng Part A*. 2014. Vol. 20, N 19-20. P. 2549–2554. doi: 10.1089/ten.tea.2013.0589
2. Fickert S., Gerwien P., Helmert B., et al. One-year clinical and radiological results of a prospective, investigator-initiated trial examining a novel, purely autologous 3-dimensional autologous chondrocyte transplantation product in the knee // *Cartilage*. 2012. Vol. 3, N 1. P. 27–42. doi: 10.1177/1947603511417616

Еремичев Р.Ю.¹ ✉, Хандохин М.М.², Александрюшкина Н.А.¹, Макаревич П.И.¹

Тканеспецифичные функции стромальных клеток человека при формировании соединительных тканей и регенерации

¹ Центр регенеративной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ eremichevry@my.msu.ru

Аннотация. Мезенхимальные стромальные клетки человека обладают автономными тканеспецифичными свойствами, которые формируются в ходе эмбрионального развития, сохраняются в постнатальном периоде и важны для реализации их функций при ответе на повреждение.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; тканеспецифичность; фиброплазия; ангиогенез; автономные свойства; транскриптом; обновление эндометрия; ответ на повреждение; регенерация; фиброз.

Eremichev R.Yu.¹, Khandokhin M.M.², Alexandrushkina N.A.¹, Makarevich P.I.¹

Tissue-specific functions of human stromal cells in the formation of connective tissues and regeneration

¹ Centre for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Human mesenchymal stromal cells possess autonomous tissue-specific properties that are formed during embryonic development, persist in the postnatal period of life and are important for the realization of their functions in response to injury.

Keywords: mesenchymal stromal cells; tissue specificity; fibroplasia; angiogenesis; autonomous properties; transcriptome; endometrial renewal; response to injury; regeneration; fibrosis.

Основным способом ответа организма человека на повреждение является формирование рубцовой ткани, как при фиброзе, так и при заживлении после повреждений. В последние годы стало известно, что эти процессы в значительной степени тканеспецифичны и протекают неодинаково в разных органах и тканях. Кроме того, сравнительные исследования эффектов мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при терапевтическом использовании также указывают на их значительное различие в зависимости от тканевого источника. Основываясь на этом, мы предположили, что МСК обладают устойчивыми (автономными) тканеспецифичными функциями, важными для реализации механизмов ответа на повреждение. Целью данной работы было выявление таких тканеспецифичных свойств и поиск дифференциально экспрессированных генов, которые могли бы объяснить их наличие.

Мы сравнили МСК, выделенные из органов, различным образом отвечающих на повреждение: кожи, заживающей путем образования рубца, и эндометрия, способного регенерировать до 400 раз за репродуктивный период жизни женщины.

Было обнаружено, что МСК дермы (МСКД) и жировой клетчатки (МСКЖТ), в отличие от МСК эндометрия (МСКЭ), при культивировании в течение 14 дней способны к формированию клеточных пластов (фиброплазии), а также к индукции ангиогенеза при сокультивировании с клетками эндотелия человека HUVEC. Таким образом мы показали, что МСК обладают автономными (сохраняющимися *in vitro*) тканеспецифичными свойствами, связанными с реализацией их функций при ответе на повреждение. Действительно, при заживлении кожи процессы фиброплазии и ангиогенеза являются ключевыми этапами формирования

грануляционной ткани, на основе которой в дальнейшем формируется соединительнотканная структура в виде рубца. Напротив, при регенерации эндометрия происходит формирование нативной стромы органа.

Чтобы выявить гены, дифференциальная экспрессия которых может быть ответственна за наличие тканеспецифичных свойств, мы сравнили транскриптомы МСКД и МСКЭ, сопоставив полученные результаты с данными секвенирования одиночных клеток из проекта «Human Protein Atlas». Транскриптомное профилирование МСКД и МСКЭ выявило 994 дифференциально экспрессированных белок-кодирующих гена, 326 из которых также были обнаружены при сравнении соответствующих стромальных клеток *in vivo*. При функциональном анализе по базе данных «Gene Ontology» оказалось, что эти гены в наибольшей степени ответственны за процессы, связанные с эмбриональным развитием и морфогенезом. Чтобы проверить важность тканеспецифичных свойств для реализации функций МСК при ответе на повреждение, мы культивировали исследуемые клетки с сывороткой менструального отделяемого (СМО), охарактеризовав предварительно ее состав. Мы обнаружили, что в СМО, в сравнении с сывороткой периферической крови, содержалось множество провоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста. Ответы МСК на СМО сравнивали при помощи транскриптомного анализа, в результате чего были обнаружены ярко выраженные тканеспецифичные различия, которые также оказались связаны с генами, ответственными за эмбриональное развитие и морфогенез.

Полученные нами результаты указывают на то, что автономные тканеспецифичные свойства МСК формируются в ходе эмбрионального развития, сохраняются в постнатальном периоде и важны для реализации их функций при ответе на повреждение.

Работа выполнена при поддержке грантов РНФ №19-75-30007(п) (*in vitro* работы, <https://rscf.ru/project/23-75-33001/>) и № 24-15-00165 (транскриптомный и биоинформатический анализ, <https://rscf.ru/project/24-15-00165/>)

Ермакова В.В. ✉, Александрова Е.В., Томилин А.Н., Кузьмин А.А.

Изучение *cis*-регуляторных взаимодействий гена *Pou5f1* в плюрипотентных и дифференцированных клетках мышей

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ v.ermakova@incras.ru

Аннотация. Сравнение линий эмбриональных стволовых клеток с трансгенным *Pou5f1* на разных стадиях дифференцировки позволило изучить регуляторные взаимодействия *Pou5f1* и его генетического окружения.

Ключевые слова: ген *Pou5f1*; эмбриональные стволовые клетки (ЭСК); плюрипотентность; наивная и праймированная стадии плюрипотентности; регуляция экспрессии генов; *cis*-регуляторные элементы (ЦРЭ); гены ГКС (главного комплекса гистосовместимости); трофобластные стволовые клетки (ТСК).

Ermakova V.V., Aleksandrova E.V., Tomilin A.N., Kuzmin A.A.

Exploring the *cis*-regulatory landscape of the *Pou5f1* gene in mouse pluripotent and differentiated cells

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Comparison of embryonic stem cell lines with transgenic *Pou5f1* on different stages of differentiation allowed to investigate the regulatory interactions of the *Pou5f1* and its genetic surroundings.

Keywords: *Pou5f1*; embryonic stem cells (ESC); pluripotency; naive and primed stages of pluripotency; regulation of gene expression; *cis*-regulatory elements (CRE); MHC (Major Histocompatibility Complex); Trophoblastic Stem cell (TSC).

Ген *Pou5f1*, кодирующий транскрипционный фактор Oct4, критически необходим для поддержания и индукции плюрипотентного состояния эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Несмотря на то, что Oct4 как транскрипционный фактор долгие годы находится в центре внимания исследований плюрипотентных клеток, ещё не до конца ясно, в какие регуляторные взаимосвязи вовлекается ген *Pou5f1*, как в поддержании плюрипотентного состояния, так и в процессе перехода клеток из плюрипотентного в дифференцированное состояние. В недавних работах было обнаружено множество ранее неизвестных регуляторных элементов гена *Pou5f1*, среди которых найдены и промоторы других белок-кодирующих генов [1, 2]. Несмотря на то, что выявленные элементы способны влиять на экспрессию *Pou5f1*, коллективный вклад этих элементов в регуляцию *Pou5f1* и иерархия их взаимодействия на разных стадиях остаются неопределёнными. Ген *Pou5f1* расположен в участке генома, известном повышенной генной плотностью, а именно: в кластере генов главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС). Многие гены, расположенные в данном кластере, играют важную роль в развитии и поддержании иммунной системы, активно экспрессируются на протяжении всего жизненного цикла клеток взрослого организма. Согласно устоявшейся парадигме, *Pou5f1* выполняет свои функции только в плюрипотентных клетках, однако работы последних лет опровергают это, указывая на атеропротективную функцию *Pou5f1* в гладкомышечных и эндотелиальных клетках кровеносных сосудов [3, 4]. Наблюдаемые в данных исследованиях эффекты могут быть результатом утери белкового продукта гена, однако, его уровень в гладкомышечных и эндотелиальных клетках на значительно ниже такового в ПСК. Учитывая это, можно предположить, что фенотипические проявления могли наблюдаться вследствие делеции промотора *Pou5f1*.

Целью настоящей работы стала оценка взаимной регуляции гена *Pou5f1* и его генетического окружения, генов МНС-локуса. В работе была получена модель на основе мышиных ЭСК, где ген *Pou5f1* с минимальным необходимым набором регуляторных элементов (конститутивный промотор, дистальный и проксимальный энхансеры) был помещён в новое генетическое окружение. При этом нокаутирована эндогенная последовательность *Pou5f1* в обоих аллелях посредством делеции области промотора-первого экзона. В качестве контрольной линии были использованы ЭСК, в которых нокаут эндогенной последовательности был осуществлен с сохранением промотора и первого экзона.

При анализе данных qRT-PCR и RNA-seq, выполненных на модельных ЭСК, изменений в уровне экспрессии генов МНС выявлено не было. Однако, уровень экспрессии МНС I и II классов в ПСК находится на крайне низком уровне, поэтому полученные линии ЭСК были принудительно дифференцированы в трофобластическом направлении. Однако и здесь различия в уровне экспрессии МНС между линиями с удалённым и сохранённым промотором не наблюдалось.

С другой стороны, способность к дифференцировке полученных ЭСК была ограничена, что, вероятно, связано с некорректным контролем экспрессии гена *Pou5f1*, изолированного от привычных регуляторных взаимосвязей. Уровень белка в таких ЭСК был на порядок ниже, чем в ЭСК с активными эндогенным *Pou5f1*. Эти клетки не были способны перейти из наивного в праймированное состояние плюрипотентности, что сказывалось на их способности к дальнейшей дифференцировке. Ранее было показано, что переход ПСК из наивного состояния в праймированное обусловлен прежде всего переключением активности проксимального и дистального энхансеров [5]. Однако наша модель, сохраняющая эти элементы на соответствующих позициях вблизи эктопически экспрессирующегося *Pou5f1*, показала, что наличие других регуляторных элементов также необходимо для перехода ЭСК между этими состояниями.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021) и гранта РФФИ 24-75-10131.

Список литературы

1. Diao Y., Fang R., Li B., et al. A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells // *Nat Methods*. 2017. Vol. 14, N 6. P. 629–635. doi: 10.1038/nmeth.4264
2. Canver M.C., Tripathi P., Bullen M.J., et al., A saturating mutagenesis CRISPR-Cas9-mediated functional genomic screen identifies cis- and trans-regulatory elements of Oct4 in murine ESCs // *J Biol Chem*. 2020. Vol. 295, N 47. P. 15797–15809. doi: 10.1074/jbc.RA120.013772
3. Cherepanova O.A., Gomez D., Shankman L.S., et al. Activation of the pluripotency factor OCT4 in smooth muscle cells is atheroprotective // *Nat Med*. 2016. Vol. 22, N 6. P. 657–665. doi: 10.1038/nm.4109
4. Shin J., Tkachenko S., Chaklader M., et al. Endothelial OCT4 is atheroprotective by preventing metabolic and phenotypic dysfunction // *Cardiovasc Res*. 2022. Vol. 118, N 11. P. 2458–2477. doi: 10.1093/cvr/cvac036
5. Choi H.W., Joo J.Y., Hong Y.J., et al., Distinct enhancer activity of Oct4 in naive and primed mouse pluripotency // *Stem Cell Rep*. 2016. Vol. 7, N 5. P. 911–926. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.09.012

Ермакова Н.Н.¹, Жукова М.А.¹ ✉, Пан Э.С.¹, Дыгай А.М.^{1,2}, Скурихин Е.Г.¹

Реакция мезенхимальных стволовых клеток и клеток неоваскулогенеза на терапию репрограммированными CD8⁺ Т-лимфоцитами карциномы легкого Льюис

¹ ФГБНУ «НИИОПП», Москва, Россия

² ФГБНУ «ТНИМЦ» НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томск, Россия

✉ mashazyk@gmail.com

Аннотация. Репрограммированные CD8⁺ Т-лимфоциты оказывают ингибирующее влияние на рекрутирование МСК и клеток неоваскулогенеза в легкие мышей с карциномой легкого Льюис. Этот механизм лежит в основе нарушения формирования сосудистой сети в опухоли при проведении клеточной терапии.

Ключевые слова: карцинома легкого Льюис; МСК; клетки неоваскулогенеза; репрограммированные CD8⁺ Т-лимфоциты; клеточная терапия.

Ermakova N.¹, Zhukova M.¹, Pan E.¹, Dygai A.^{1,2}, Skurikhin E.¹

Reaction of mesenchymal stem cells and neovasculogenesis cells to reprogrammed CD8⁺ T-cells therapy of lewis lung carcinoma

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

² Goldberg ED Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. Reprogrammed CD8⁺ T-cells have an inhibitory effect on the recruitment of MSCs and neovasculogenesis cells into the lungs of mice with Lewis lung carcinoma. This mechanism underlies the disruption of vascular network formation in the tumor during cell therapy.

Keywords: Lewis lung carcinoma; MSCs; neovasculogenesis cells; reprogrammed CD8⁺ T-cells; cell therapy.

Значение неоваскулогенеза в развитии злокачественных новообразований трудно переоценить. От степени развития микроциркуляторного русла, интенсивности кровотока и ангиогенеза зависят рост и метастазирование опухоли [1–3]. Без капиллярной сети опухоль была бы ограничена в кислороде и питательных веществах. Неоваскуляризация опухоли является следствием взаимодействия опухолевых клеток и компонентов опухолевого микроокружения, в том числе мезенхимальных стволовых клеток (МСК), эндотелиальных клеток, клеток воспаления, фибробластов [3].

Ранее нами предложен подход борьбы с истощением CD8⁺Т-лимфоцитов путем применения ингибитора MEK и блокатора PD-1 [4]. Таргетность репрограммированных CD8⁺ Т-лимфоцитов (pCD8Т) в отношении опухоли достигалась путем их инкубирования с лизатом стволовых опухолевых клеток (СОК). Введение pCD8Т успешно препятствовало росту и метастазированию карциномы легкого Льюис (LLC). С учетом роли неоваскуляризации в опухолевой прогрессии целью настоящего исследования явилось изучение влияния клеточной терапии pCD8Т костного мозга здоровых мышей линии C57BL/6 на сосудистую сеть опухоли, МСК и клетки неоваскулогенеза мышей линии C57BL/6 в условиях ортотопической LLC.

Показано, что клеточная терапия pCD8Т значительно уменьшала размер опухолевого узла в легких мышей с ортотопической LLC по сравнению с мышами с карциномой легкого без клеточной терапии. При этом наблюдалось уменьшение количества кровеносных сосудов в опухолевом узле. Изучение содержания клеток неоваскулогенеза в тканях показало уменьшение количества МСК (CD45⁺CD31⁺CD34⁺CD44⁺),

клеток-предшественников ангиогенеза (CD45⁻CD117⁺CD309⁺), CD309⁺ эндотелиальных клеток, фиброцитов миелоидного (CD45⁺CD34⁺CD31⁻) и немиелоидного (CD45⁺CD34⁻CD31⁻) происхождения, лейкоцитов (CD45⁺) в легких мышей в условиях ортотопической LLC, получавших pCD8T, по отношению к нелеченым мышам, при этом их число в крови увеличивалось.

Таким образом, pCD8T не только элиминируют опухолевые клетки и стволовые опухолевые клетки, как было продемонстрировано ранее [4], но и препятствуют рекрутированию клеток неоваскулогенеза в легкие, что нарушает формирование сосудистой сети в опухоли. Сочетание этих двух механизмов противоопухолевой активности у pCD8T может быть полезным в разработке эффективного подхода терапии рака легкого.

Список литературы

1. Kazerounian S., Lawler J. Integration of pro- and anti-angiogenic signals by endothelial cells // *J Cell Commun Signal*. 2018. Vol. 12, N 1. P. 171–179. doi: 10.1007/s12079-017-0433-3
2. Klein D. The tumor vascular endothelium as decision maker in cancer therapy // *Front Oncol*. 2018. Vol. 8. ID 367. doi: 10.3389/fonc.2018.00367
3. Jiang X., Wang J., Deng X., et al. The role of microenvironment in tumor angiogenesis // *J Exp Clin Cancer Res*. 2020. Vol. 39, N 1. ID 204. doi: 10.1186/s13046-020-01709-5
4. Skurikhin E.G., Pershina O., Ermakova N., et al. Reprogrammed CD8⁺ T-lymphocytes isolated from bone marrow have anticancer potential in lung cancer // *Biomedicines*. 2022. Vol. 10, N 6. ID 1450. doi: 10.3390/biomedicines10061450

Ермакова П.С.¹ ✉, Васильчикова Е.А.¹, Батенькин М.А.², Богомолова А.Ю.¹, Луговая Л.А.¹, Чесноков С.А.², Загайнов В.Е.^{1,3}, Загайнова Е.В.^{1,4}, Кашина А.В.^{1,4}

Биоинженерный трансплантат на основе инкапсулированных островков Лангерганса

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Институт металлорганической химии им. Г.А. Разуваева РАН, Нижний Новгород, Россия

³ Нижегородский областной клинический онкологический диспансер, Нижний Новгород, Россия

⁴ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

✉ bardina-polina@mail.ru

Аннотация. Исследование направлено на повышение эффективности трансплантации островков Лангерганса с использованием новой микрокапсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат». Они продлевают срок функционирования ОЛ, но в дальнейшем они могут быть доработаны и стабилизированы для продления срока их целостности.

Ключевые слова: островок Лангерганса; инкапсуляция; микрокапсулы; альгинат; ПМЭТАХ; трансплантация; диабет.

Ermakova P.S.¹, Vasilchikova E.A.¹, Baten'kin M.A.², Bogomolova A.Yu.¹, Lugovaya L.A.¹, Chesnokov S.A.², Zagainov V.E.^{1,3}, Zagainova E.V.^{1,4}, Kashina A.V.^{1,4}

Bioengineered transplant based on encapsulated Langerhans islets

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Razuvaev Institute of Organometallic Chemistry, Nizhny Novgorod, Russia

³ Nizhny Novgorod Regional Oncology Dispensary, Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Lopukhin federal research and clinical center of physical-chemical medicine, Moscow, Russia

Abstract. The study aims to enhance the efficiency of islets of Langerhans transplantation using a new microcapsule “alginate-PMETAC-alginate”. They extend the functioning period of Langerhans islets, but they can be further improved and stabilized to prolong their integrity.

Keywords: islet of Langerhans; encapsulation; microcapsules; alginate; PMETAC; transplantation; diabetes.

Исследование направлено на повышение эффективности трансплантации островков Лангерганса (ОЛ) с использованием новой технологии микроинкапсуляции, способной значительно увеличить продолжительность их функционирования. Этот метод становится все более актуальным в условиях постоянного поиска способов противодействия отторжению трансплантатов и повышения их выживаемости в организме. В рамках данного исследования изучается новый подход к продлению функционирования трансплантата ОЛ с применением микрокапсул, содержащих уникальное сочетание альгината и полимера (поли-[2-(метакрилоилокси)этил]триметиламмонийхлорида) (ПМЭТАХ). Основной целью является изучение микрокапсул на основе «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» с островками Лангерганса, а также оценка возможности применения микрокапсул для продления срока функционирования трансплантата.

Ультраструктура микрокапсул была изучена с использованием электронной микроскопии.

Было проведено тестирование капсул с содержанием ПМЭТА от 1 до 0,01% с целью получения оптимальных свойств. Соответствующие тесты проводились для исследования устойчивости к осмотической деформации, стабильности капсул при вымывании из альгината сшивающих ионов. Проницаемость капсул была оценена с помощью FITC-меченых лектинов. Жизнеспособность ОЛ была исследована с применением

окрашивания Live/Dead, а их функциональная активность изучена с использованием иммунофлуоресцентного анализа содержания инсулина. Проведен анализ функциональной активности ОЛ и свойство капсул в исследовании *in vivo* оценивалась по снижению уровня глюкозы у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом. Для этого инкапсулированные ОЛ кроликов, были пересажены крысам. В качестве контрольной группы использовались крысы с диабетом без лечения. Снижение уровня глюкозы у крыс с диабетом и трансплантированными инкапсулированными ОЛ по отношению к крысам с диабетом без лечения показывало сохранение функциональной активности ОЛ и диффузию инсулина из капсул. Так же были подтверждены защитные свойства капсул по отношению к не инкапсулированным ОЛ. Исследования проводились как в случае ксенотрансплантации, где крысам трансплантировались ОЛ кроликов для увеличения иммунологического ответа, так и в случае близкородственной трансплантации, между одной линией крыс, для снижения иммунологического ответа. Таким образом, сравнение сроков функциональной активности инкапсулированных островков кролика с не инкапсулированными островками кролика доказывает иммунопротекторные свойства капсул. Сравнение с группой близкородственной трансплантации показывает, что ОЛ в капсулах выживают лучше даже при снижении иммунной реакции. Исследовали биосовместимость капсул проводилось с использованием гистологического анализа.

Результаты исследования подтверждают, что капсулы «альгинат-ПМЭТАХ-альгинат» обладают трёхслойной структурой. Микрокапсулы имеют рыхлый альгинатный кор, покрытый плотным слоем полимера, который отвечает за стабильность и проницаемость и тонким третьим слоем альгината который улучшает биосовместимость. Тесты показали, что с увеличением концентрации полимера стабильность капсулы увеличивается. Несмотря на то, что все капсулы прошли тест на устойчивость к деформации осмотическим давлением, только капсулы 0,4% и 1% ПМЭТАХ оказались стабильными в тесте на вымывание из альгината сшивающих ионов. Тем не менее только капсулы 0,4% ПМЭТАХ обладают необходимой избирательной проницаемостью: они пропускают низкомолекулярные соединения (36 кДа), но не пропускают высокомолекулярные соединения (120 кДа). Результаты оценки жизнеспособности ОЛ показали, что после инкапсуляции не было обнаружено статистически значимой разницы в количестве жизнеспособных клеток ($85,66 \pm 1,743\%$) по сравнению с не инкапсулированными ОЛ ($88,64 \pm 1,561\%$, $p = 0,08$). Не инкапсулированные ОЛ продуцируют $4,83 \pm 0,26$ мкЕд/мл инсулина, в то время как после инкапсуляции синтез инсулина составляет $4,64 \pm 0,29$ мкЕд/мл. Нет статистически значимой разницы между уровнем синтеза инсулина ОЛ до и после инкапсуляции ($P = 0,08$). Таким образом можно заключить то, что островки получают все необходимые им вещества, также они синтезируют инсулин, как до, так и после инкапсуляции. Исследования *in vivo* показывают, что капсулы проницаемы для инсулина, и клетки ОЛ сохраняют функциональную активность; трансплантированные ОЛ в капсулах снижают уровень глюкозы в крови крыс на 33%. Ксеногенная трансплантация не инкапсулированных ОЛ вызывает больший иммунный ответ, чем близкородственная и выражена в сокращении срока функционирования ОЛ кроликов по сравнению к ОЛ крыс. Таким образом, сравнение срока функционирования инкапсулированных ОЛ кролика в крысах (до 3 месяцев) со свободными ОЛ кроликов (до 7 дней) показывает, что капсулы защищают от иммунной системы. Сравнение сроков функциональной активности инкапсулированных ОЛ кролика и с группой близкородственной трансплантации (до 14 дней) показывает, что ОЛ лучше выживают в капсулах даже при отсутствии иммунной реакции. Капсулы биологически совместимы, не вызывают воспаления и фиброза. Однако за счет макрофагальной реакции микрокапсулы теряют целостность через месяц после трансплантации, но ОЛ после этого могут сохранять свою функциональную активность. Таким образом, микрокапсулы продлевают срок функционирования ОЛ, но в дальнейшем они могут быть доработаны и стабилизированы для продления срока их целостности.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-65-00044.

Ермаков И.М.¹ ✉, Постников А.Б.², Серебряная Д.В.¹

Исследование PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при моделировании сенесцентного фенотипа в первичной нейроглиальной культуре под действием этопозида

¹ МГУ имени Ломоносова, Москва, Россия

² ООО «Хайтест», Турку, Финляндия

✉ ivanermakov981@gmail.com

Аннотация. В настоящей работе было проведено моделирование сенесцентного фенотипа астроцитов мозга крыс под действием 25 и 50 мкМ этопозида и изучено его влияние на PAPP-A-опосредованный протеолиз IGFBP-4. Показано, что протеолиз IGFBP-4 в данной модели повышается в 3 и 7 раз соответственно.

Ключевые слова: сенесцентный фенотип; астроциты; IGFBP-4; PAPP-A; IGF; протеолиз.

Ermakov I.M.¹, Postnikov A.B.², Serebryanaya D.V.¹

Investigation of PAPP-A-specific IGFBP-4 proteolysis in primary neuroglial senescent model induced by etoposide

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² HyTest Ltd., Turku, Finland

Abstract. In this study we modeled senescent phenotype in rat's brain primary astrocyte culture using 25 and 50 μ M etoposide and analyzed its effect on PAPP-A specific IGFBP-4 proteolysis. Our study demonstrated that PAPP-A-mediated proteolysis of IGFBP-4 increases in this model by 3 and 7 folds respectively.

Keywords: senescent phenotype; astrocyte; IGFBP-4; PAPP-A; IGF; proteolysis.

Возникновение множества возраст-зависимых заболеваний может быть связано с клетками в сенесцентном состоянии [1]. В мозге астроциты в сенесцентном состоянии являются причиной многих патологических состояний и приводят к развитию нейродегенеративных заболеваний. В таких условиях в нервной ткани возрастает необходимость в активации нейропротекторных механизмов и секреции веществ, способствующих сохранению жизнеспособности клеток нервной ткани. Одними из таких нейропротекторных трофических агентов являются инсулиноподобные факторы роста IGF-1 и IGF-2, которые активируют пролиферацию и клеточный рост нейронов и астроцитов при взаимодействии со специфическими рецепторами [2]. Биодоступность IGF для их специфических рецепторов регулируется с одной стороны благодаря взаимодействию с шестью белками, связывающими IGF (IGF-binding proteins/IGFBPs) и ингибирующими их клеточные эффекты, а с другой стороны — под действием специфических протеаз, которые, напротив, способствуют взаимодействию IGF с рецептором. Одной из таких протеаз является PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A), специфически расщепляющая IGFBP-4 с образованием двух фрагментов: N-концевого (NT-IGFBP-4) и C-концевого (CT-IGFBP-4). Для индукции сенесцентного фенотипа в клеточных культурах можно использовать этопозид — ингибитор топоизомеразы 2 [3]. Целью нашей работы являлось исследование протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A в нейроглиальных культурах при моделировании сенесцентного фенотипа в присутствии 25 мкМ и 50 мкМ этопозида. В данной работе мы получили первичную нейроглиальную культуру из мозга неонатальных крыс и иммуноцитохимически охарактеризовали её, используя антитела к GFAP и S100B [4]. Содержание астроцитов в культуре составило $98 \pm 1\%$. Для моделирования сенесцентного фенотипа к первичной нейроглиальной культуре добавляли

этопозид в конечных концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ и инкубировали в течение 24 и 48 часов. Развитие сенесцентного фенотипа подтверждали несколькими способами:

- 1) по изменению морфологии астроцитов на более уплощённую и округлую;
- 2) уменьшению жизнеспособности астроцитов на 20 и 50% через 24 и 48 часов инкубации с 25 мкМ этопозидом, соответственно; а в концентрации 50 мкМ — на 30 и 70% при аналогичных временах инкубации;
- 3) прекращению пролиферативной активности астроцитов по мере увеличения концентрации этопозидом;
- 4) возрастанию экспрессии β -галактозидазы, ассоциированной с сенесцентностью в 1,6 раз после инкубации с этопозидом;
- 5) увеличению количества секретируемого IL-6 до 2,3 мкг на 1 мг белка после инкубации с 25 мкМ этопозидом и до 6,5 мкг на 1 мг белка после инкубации с 50 мкМ этопозидом [5].

При моделировании сенесценции в астроцитах под действием 25 мкМ и 50 мкМ этопозидом продемонстрировано, что уровень PAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 возрастает в 3 и 7 раз, соответственно. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что уровень протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в астроцитах возрастает при их переходе в сенесцентное состояние под действием этопозидом. Причём количество сенесцентных клеток и PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4-IGF-2 положительно коррелируют как с количеством добавленного этопозидом, так и с временем инкубации с ним. Полученные нами результаты могут свидетельствовать о повышенном высвобождении IGF в нервной ткани в условиях сенесцентности, что может потенциально быть рассмотрено, как компенсаторный нейропротекторный механизм.

Список литературы

1. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., van Deursen J.M. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy // *Nature Med.* 2015. Vol. 21. P. 1424–1435. doi: 10.1038/nm.4000
2. Dya G.A., Klychnikov O.I., Adasheva D.A., et al. IGF-binding proteins and their proteolysis as a mechanism of regulated IGF release in the nervous tissue // *Biochemistry (Moscow)*. 2023. Vol. 88, N S1. P. S105–S122. doi: 10.1134/S0006297923140079
3. Conover C.A., Bale L.K. Senescence induces proteolytically-active PAPP-A secretion and association with extracellular vesicles in human pre-adipocytes // *Exp Gerontol.* 2023. Vol. 172. ID 112070. doi: 10.1016/j.exger.2022.112070
4. *The biology of glial cells: recent advances* / I. Patro, P. Seth, N. Patro, et al., editors. Singapore: Springer nature, 2022. 745 p. doi: 10.1007/978-981-16-8313-8
5. Di Micco R., Krizhanovsky V., Baker D., d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021. Vol. 22. P. 75–95. doi: 10.1038/s41580-020-00314-w

Ерофеева Л.М.¹ ✉, Дорохович Г.П.²

Особенности регенерации тимуса и красного костного мозга мышей после однократного облучения ускоренными ионами углерода

¹ НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

² УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

✉ gystology@mail.ru

Аннотация. Однократное общее облучение мышей ускоренными ионами углерода в дозе 4,0 Гр вызывает опустошение красного костного мозга и коркового вещества тимуса в первые трое суток. Регенерация начинается с 3-х суток, достигая максимума в костном мозге на 30-е, в тимусе — на 15-е сутки с повторным опустошением к 30-м. Полной регенерации клеточного состава органов не происходит и к 60-м суткам.

Ключевые слова: облучение; ускоренные ионы углерода; тимус; красный костный мозг; регенерация.

Erofeeva L.M.¹, Dorokhovich H.P.²

Features of thymus and red bone marrow regeneration in mice after a single irradiation with accelerated carbon ions

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

² Belarussian State Medical University, Minsk, Belarus

Abstract. A single total irradiation of mice with accelerated carbon ions at a dose of 4.0 Gy. It causes devastation of the red bone marrow and thymic cortex in the first three days. Regeneration begins on day 3, reaching a maximum in the bone marrow on day 30, in the thymus on day 15 with repeated emptying by day 30. Complete regeneration of the cellular composition of organs does not occur even by 60 days.

Keywords: irradiation; accelerated carbon ions; thymus; red bone marrow; regeneration.

Изучение постлучевых процессов в системе иммуногенеза при воздействии ускоренными заряженными частицами является актуальной задачей в связи с планированием полетов человека в дальний космос [1]. Галактическое космическое излучение, представляющее основную радиационную опасность при межпланетных космических полетах, состоит из электронов, протонов с высокой энергией и тяжелых заряженных частиц (ТЗЧ) [1]. Цель работы — изучить клеточный состав красного костного мозга и морфофункциональных компонентов тимуса мышей в остром периоде после общего однократного облучения ТЗЧ и регенерацию в отдаленные сроки.

Мыши-самцы линии Balb/c 3,5–4-месячного возраста (56 особей) были однократно облучены ускоренными ионами углерода с энергией 300 МэВ/нуклон на синхрофазотроне ОИЯИ (г. Дубна) в дозе 4,0 Гр. После облучения мышей выводили из эксперимента по 8 особей на 1, 3, 7, 14, 21, 30 и 60 сутки. Контроль составили интактные мыши.

Результаты показали опустошение красного костного (КМ) мозга в остром периоде после облучения. Прослеживался фазный характер постлучевых процессов. Относительное количество ядродержащих клеток достигало 26,3% и 19,6% на 1 и 3 сутки после облучения соответственно. В последующие сроки происходило постепенное нарастание числа кариоцитов вплоть до 30 суток, когда количество их достигло 72,0% от контрольного значения. На таком уровне этот показатель сохранялся до конца периода наблюдения, не достигая контрольной величины даже к 60 суткам.

В тимусе (Т) выявлена аналогичная динамика постлучевых изменений. Повреждались, в основном, бластные формы клеток, т.е. преобладала репродуктивная гибель лимфоцитов. Нарастание процессов деструкции клеток и прогрессивное уменьшение количества малых лимфоцитов в коре Т наблюдалось до 3 суток, после чего отмечены признаки регенерации лимфоидной ткани. Постлучевое восстановление лимфоцитов в Т происходит как за счет собственных выживших предшественников, так и за счет поступления предшественников из КМ. Особенностью восстановительных процессов в Т является резкий подъем митотической активности и увеличение количества малодифференцированных форм клеток уже на 3 сутки после облучения. В последующей динамике восстановительных процессов отмечается пик на 15 сутки, когда содержание малых лимфоцитов превышало уровень контроля во всех структурных компонентах органа. Однако с 15 до 60 суток доля малых лимфоцитов неуклонно уменьшалась и в конце исследования была статистически значимо меньше уровня контроля. Известно, что ТЗЧ вызывают двуниевые разрывы ДНК, которые относятся к нерепарируемым повреждениям, поэтому клетка погибает при переходе из G1 в S период клеточного цикла. По-видимому, этим объясняется уменьшение числа кариоцитов в КМ и малодифференцированных предшественников в Т соответственно. Как следствие нарушается созревание и дифференцировка лимфоцитов в Т в отдаленные сроки после облучения ТЗЧ, что может явиться причиной постлучевых иммунодефицитных состояний [1].

Вывод. Однократное облучение ускоренными ионами углерода с энергией 300 МэВ/нуклон в дозе 4,0 Гр приводит к опустошению КМ и коркового вещества Т в первые трое суток. Регенерация начинается с 3 суток, достигая максимума в КМ на 30, а в Т — на 15 сутки. Однако в дальнейшем в Т отмечено повторное опустошение. Контрольных показателей ни в КМ, ни в Т клеточный состав не достигает и к 60 суткам постлучевого периода.

Список литературы

1. Федоренко Б.С., Трусов В.С. Сравнительный риск развития опухолей молочных желез у крыс, облученных ускоренными заряженными частицами высоких энергий и гамма-лучами // Вопросы онкологии. 2003. № 5. С. 623–629. EDN: MPPGFB

Ерошенко М.Н.¹ ✉, Грехнёв Д.А.¹, Лебедева О.С.^{2,3}, Воловиков Е.А.^{2,3}, Беликова Л.Д.^{2,3}, Вигонт В.А.¹

Повышенный уровень STIM1 опосредует увеличенную активность депо-управляемых кальциевых каналов в дофаминергических нейронах, специфичных для пациентов с болезнью Паркинсона

¹ ФГБУН «Институт цитологии РАН», Санкт-Петербург, Россия

² ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

✉ mni15996@gmail.com

Аннотация. Мы обнаружили, что в дофаминергических нейронах пациентов с болезнью Паркинсона уровень белка STIM1 повышен, что коррелирует с увеличением амплитуды депо-управляемого входа кальция. Подавление STIM1 с помощью РНК-интерференции снижало данные кальциевые токи до нормальных значений.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация; депо-управляемый вход кальция; нейродегенеративные заболевания; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; STIM1.

Eroshenko M.N.¹, Grekhnev D.A.¹, Lebedeva O.S.^{2,3}, Volovikov E.A.^{2,3}, Belikova L.D.^{2,3}, Vigont V.A.¹

Increased level of STIM1 drives the abnormal activity of store-operated calcium channels in dopaminergic neurons specific for patients with Parkinson's disease

¹ Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Here we found that the level of STIM1 protein is increased in Parkinson's disease-specific dopaminergic neurons. This correlated with the enhanced store-operated calcium entry. Suppression of STIM1 with shRNA reduced this calcium current to the normal values.

Keywords: calcium signaling; store-operated calcium entry; neurodegenerative diseases; induced pluripotent stem cells; STIM1.

Кальциевая сигнализация играет фундаментальную роль в регуляции клеточных функций, являясь одним из наиболее универсальных механизмов в биологии клетки. Ионы кальция участвуют практически во всех клеточных процессах, начиная от передачи сигналов и заканчивая активацией ферментов. Нарушения в регуляции кальциевого гомеостаза часто приводят к развитию различных патологий, среди которых особое место занимают нейродегенеративные заболевания. Наши исследования сосредоточены на том, как эти нарушения способствуют прогрессированию нейродегенеративных расстройств, таких, в частности, как болезнь Паркинсона (БП). В качестве объекта исследования мы использовали модели, полученные путем направленной дифференцировки в дофаминергические нейроны стриатума индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с БП и здоровых доноров [1]. Используя метод пэтч-кламп и флуоресцентный кальциевый имиджинг, мы продемонстрировали, что токи кальция через депо-управляемые кальциевые каналы в дофаминергических нейронах, специфичных для БП, существенно выше, чем

в тех же нейронах, специфичных для здоровых доноров. С помощью вестерн-блоттинга мы обнаружили, что уровень известного активатора депо-управляемых кальциевых каналов STIM1 значительно повышен в БП-специфичных нейронах. Для того, чтобы проверить, действительно ли именно повышенный уровень STIM1 связан с увеличенным депо-управляемым входом кальция (SOCE) при БП, мы подавили экспрессию STIM1 в БП-специфичных нейронах с помощью shRNA и показали, что в таких условиях амплитуда SOCE значительно падает, возвращаясь к нормальным значениям. Таким образом, STIM1 может быть потенциальной мишенью для разработки лекарств, направленных на восстановление кальциевого гомеостаза при БП. Также наши исследования подчеркивают важность разработки высокоспецифичных методов терапии различных нейродегенеративных заболеваний, поскольку ранее в нашей лаборатории было показано, что увеличение SOCE при болезни Хантингтона связано с другим активатором депо-управляемых каналов — белком STIM2 [2].

Данная работа поддержана грантом РФФ № 22-14-00218.

Список литературы

1. Lebedeva O.S., Sharova E.I., Grekhnev D.A., et al. An efficient 2D protocol for differentiation of iPSCs into mature postmitotic dopaminergic neurons: Application for modeling Parkinson's disease // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 8. ID 7297. doi: 10.3390/ijms24087297
2. Vigont V.A., Grekhnev D.A., Lebedeva O.S., et al. STIM2 mediates excessive store-operated calcium entry in patient-specific iPSC-derived neurons modeling a juvenile form of Huntington's disease front // *Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 9. ID 625231. doi: 10.3389/fcell.2021.625231

Ершов Б.П. ✉, Антошин А.А., Волошин С.Ю., Гилязова А.Н., Христидис Я.И., Истранова Е.В.,
Файзуллин А.Л., Бутнару Д.В., Тимашев П.С.

Применение коллагеновых матриц с Янус-структурой в модели аугментационной уретропластики у кроликов

Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

✉ ershov_b_p@staff.sechenov.ru

Аннотация. В модели аугментационной уретропластики у кроликов был обнаружен феномен вторичного стриктурирования после почти полной регенерации слизистой оболочки уретеры при помощи биосовместимой матрицы. Этот факт должен учитываться при планировании лечения пациентов со стриктурой уретры современными биоматериалами.

Ключевые слова: коллагеновые матрицы; Янус-структура; тканевая инженерия; аугментационная уретропластика; урология; регенеративная медицина.

Ershov B.P., Antoshin A.A., Voloshin S.Yu., Gilyazova A.N., Khristidis Ya.I., Istranova E.V., Fayzullin A.L.,
Butnaru D.V., Timashev P.S.

Application of collagen matrices with Janus structure in augmentation urethroplasty rabbit model

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. The phenomenon of secondary stricturing after complete regeneration of the urethral mucosa using a biocompatible matrix was detected in a rabbit model of augmentation urethroplasty. This fact should be taken into account planning the treatment of urethral stricture patients with modern biomaterials.

Keywords: collagen matrices; Janus structure; tissue engineering; augmentation urethroplasty; urology; regenerative medicine.

Стриктуры уретры выявляются у мужчин с частотой 229–627 на 100 000 в зависимости от региона [1]. Одним из методов лечения является уретропластика — вмешательство, в ходе которого пораженный участок уретры замещается аутотрансплантатов (преимущественно, участком щеки или кожей половых органов). Однако, данное вмешательство связано с риском дефицита донорской ткани, актуальном при протяженных стриктурах, а также с рубцовыми, инфекционными и другими осложнениями в донорском участке. Применение тканеинженерных трансплантатов способно снизить количество данных нежелательных осложнений. В данной работе применяются коллагеновые матрицы с Янус-структурой в модели аугментационной уретропластики у кроликов.

Коллагеновые матрицы были получены методом электрофоретического осаждения с применением полупроницаемого барьера из ахилловых сухожилий крупного рогатого скота [2]. В качестве модели использовали кроликов породы Советская шиншилла с полностью сформированной мочеполовой системой. Протяженный дефект уретры моделировали путем резекции дорсальной проксимальной части пенильного и дистальной части луковичного отдела уретры. Данные участки в экспериментальной группе ($n = 15$) были замещены коллагеновыми мембранами. В контрольной группе ($n = 15$) замещения не производили. Кроликов обеих групп выводили из эксперимента на 5, 15, 45, 90, 180, 270 сутки после вмешательства.

В экспериментальной группе признаки регенерации эпителия отмечали на 5 сутки после операции, а к 15 суткам до половины площади поверхности импланта покрывалась малодифференцированным

уротелием. На данной временной точке отмечали начальные стадии процесса резорбции матрицы и врастания в нее сосудов. Полное покрытие эпителием поверхности матрицы отмечали на 45 сутки. Под уротелием наблюдали чередование остатков импланта, собственных коллагеновых волокон и сосудов. На 90 сутки регенерация слизистой практически завершалась: эпителий заканчивал дифференцировку, появлялись сосочки слизистой. Уровень α -SMA свидетельствовал о низкой активности макрофагов. Однако, на 180–270 сутки отмечали участки выраженного фиброза соединительно-тканной оболочке с резким сужением просвета уретры. В контрольной группе до 90% площади поверхности импланта к 8 суткам покрывалась низкодифференцированным эпителием, который приобретал признаки дистрофии на 45 сутки. На 15 сутки отмечали выраженный фиброз, который прогрессировал вплоть до 180 суток, приобретая участки гиалиноза. Однако, степень фиброза на 270 день в экспериментальной группе была ниже, чем на 45 сутки в контроле.

Таким образом, разработанные коллагеновые матрицы показали высокую биосовместимость и выраженные прорегенеративные характеристики. Однако, наблюдение более длительных точек (180–270 сутки) позволило выявить феномен вторичного структурирования уретры, который должен быть изучен в последующих работах. Данный феномен должен учитываться при планировании уретропластики с применением современных биоматериала у человека.

Список литературы

1. Amjad A., Blaschko S.D., McAninch J.W., Breyer B.N. Epidemiology of urethral strictures // *Translational andrology and urology*. 2014. Vol. 3, N 2. P. 209–213. doi: 10.3978/j.issn.2223-4683.2014.04.07
2. Antoshin A., Dubinin O., Miao L., et al. Semipermeable barrier-assisted electrophoretic deposition of robust collagen membranes // *J Mater Sci*. 2023. Vol. 58. P. 9675–9697. doi: 10.1007/s10853-023-08641-x

Ефлова Д.С.¹ ✉, Немтарев А.В.¹, Кузнецова Е.В.¹, Ергешов А.А.¹, Муллин Р.И.^{1,2}, Абдуллин Т.И.¹

Некоторые антибактериальные и регенеративные эффекты биополимерных комплексов серебра в модели инфицированной раны кожи

¹ ФГАОУВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² ГАУЗ Республиканская клиническая больница МЗ РТ, Казань, Россия

✉ daraeflova9387@gmail.com

Аннотация. В данной работе проведено тестирование различных биополимерных комплексов серебра на оптимизированной модели экцизионной раны у крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* с последующим проведением морфологического и цитологического анализа.

Ключевые слова: антибактериальные агенты; комплексы и наночастицы серебра; заживление ран; регенерация кожи; *in vivo* модели.

Eflova D.S.¹, Nemtarev A.V.¹, Kuznetsova E.V.¹, Yergeshov A.A.¹, Mullin R.I.^{1,2}, Abdullin T.I.¹

Some antibacterial and regenerative effects of silver biopolymer complexes in the infected skin wound model

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

² Republican Clinical Hospital of Ministry of Health of Republic of Tatarstan, Kazan, Russia

Abstract. In this work, various silver biopolymer complexes were tested on an optimized model of the excision wound of rats infected with *Staphylococcus aureus*, followed by morphological and cytological analysis.

Keywords: antibacterial agents; silver complexes and nanoparticles; wound healing; skin regeneration; *in vivo* models.

Соединения серебра остаются одними из наиболее популярных антимикробных агентов для создания лекарственных средств и изделий медицинского назначения, что обусловлено их эффективностью в отношении различных микроорганизмов, включая резистентные штаммы, при относительной безопасности для организма. При местном применении предпочтение зачастую отдается формулировкам серебра в форме наноразмерных частиц благодаря пролонгированному высвобождению активных ионов серебра, а также возможности комбинирования с медицинскими материалами. Широко используемые в клинической практике протеинаты серебра, такие как протаргол, при определенных назначениях могут проявлять побочные эффекты, что обуславливает актуальность создания серебросодержащих соединений и наночастиц — аналогов [1].

В настоящей работе проведено первичное тестирование новых биополимерных комплексов серебра в качестве антибактериальных агентов *in vivo*. Тестируемые комплексы имели варьируемое относительное содержание серебра (1–10%), а также различались по степени окисления металла (+1/0). По данным динамического рассеяния света все комплексы формировали в водных растворах достаточно однородные наноразмерные системы. Была использована оптимизированная модель экцизионной раны у крыс, инфицированной *Staphylococcus aureus*, для изучения эффектов антибактериальных наноразмерных формулировок при аппликации на рану [2]. Обработку ран тестируемыми комплексами проводили после развития инфекции посредством нанесения растворов соединений. Проводили гистологический анализ срезов регенерирующей кожи преимущественно в остром периоде (в течение 14 дней). Срезы окрашивали по Пикро–Маллори

и Гимзе; последнее окрашивание позволило оценить относительное содержание бактериальных агрегатов в коже [2].

Обработка тестируемыми комплексами и протарголом в значительной степени снижала общее количество бактерий в раневом ложе и предотвращало появления агрегатов в нижележащих тканях уже на раннем этапе наблюдения. По сравнению с протарголом тестируемые комплексы проявили повышенный антибактериальный эффект, который при этом различался для формулировок, содержащих металлическое и ионизированное серебро. Антибактериальная активность соединений улучшала регенерацию кожи по данным морфологического и цитологического анализа тканей на более позднем этапе наблюдения. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего сравнительного изучения терапевтического потенциала и механизмов действия полученных биополимерных комплексов серебра.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

Список литературы

1. Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., et al. Similarities and differences between silver ions and silver in nanoforms as antibacterial agents // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, N 2. ID 444. doi: 10.3390/ijms19020444
2. Perni S., Alotaibi H.F., Yergeshov A.A., et al. Long acting anti-infection constructs on titanium // *J Control Release*. 2020. Vol. 326. P. 91–105. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.013

Ефлова Д.С.¹ ✉, Ергешов А.А.¹, Галлямов А.Р.², Абдуллин Т.И.¹, Муллин Р.И.^{1,2}

Разработка способа децеллюляризации периферических нервов

¹ ФГАОУВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, Россия

² ГАУЗ Республиканская клиническая больница МЗ РТ, Казань, Россия

✉ daraeflova9387@gmail.com

Аннотация. В данной работе была проведена децеллюляризация периферических нервов с помощью новой методики, основанной на применении в качестве детергентов химически модифицированных сополимеров этиленоксида и пропиленоксида, с последующей оценкой удаления клеток.

Ключевые слова: регенерация периферического нерва; графты нерва; децеллюляризация.

Eflova D.S.¹, Yergeshov A.A.¹, Gallyamov A.R.², Abdullin T.I.¹, Mullin R.I.^{1,2}

Development of a procedure for decellularization of peripheral nerves

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Republican Clinical Hospital of Ministry of Health of Republic of Tatarstan, Kazan, Russia

Abstract. In this work, decellularization of peripheral nerves was performed using a new technique based on the use of chemically modified ethylene oxide and propylene oxide copolymers as detergents, followed by an assessment of cell removal.

Keywords: peripheral nerve repair; nerve grafts; decellularization.

Травматические повреждения периферических нервов, сопровождающиеся образованием диастаза, являются распространенным видом травм, характеризующихся длительным сроком восстановления и риском инвалидизации. «Золотым» стандартом в лечении подобных повреждений является использование аутонервной вставки, существенными недостатками которой являются необходимость иссечения фрагмента интактного нерва, вариабельность его свойств, в том числе, несоответствие размеру поврежденного нерва, возможное образование невром и др. В качестве перспективной замены аутонервной вставке рассматриваются децеллюляризованные алло- и ксенографты, получаемые из эксплантатов донорских периферических нервов. Подобные графты, сохраняющие структурную организацию внеклеточного матрикса, могут иметь стандартизированные размеры и регенеративные свойства. Однако, их применение требует проведения эффективной очистки тканей от клеточных компонентов без разрушения каркасной структуры матрикса. Существующие способы получения децеллюляризованных периферических нервов и других тканевых графтов характеризуются повышенной длительностью и трудоемкостью [1], что обуславливает актуальность создания новых методик для решения этой задачи.

В настоящей работе исследована возможность получения децеллюляризованных периферических нервов с помощью новой методики, основанной на применении в качестве детергентов химически модифицированных сополимеров этиленоксида и пропиленоксида с различными свойствами. Методикой сравнения служил ранее предложенный протокол, основанный на последовательном применении Тритона X-100 и дезоксихолата; при этом один цикл обработки тканей детергентами составляет около 45 ч [2]. Отработку методики проводили на эксплантатах различных периферических нервов, хирургически выделенных из карликовых свинок *post mortem* (после выведения в ходе других экспериментов). Свежевыделенные эксплантаты замораживали и хранили при температуре -80°C . После разморозки образцы выдерживали вначале в дистиллированной воде и далее в растворе детергента с различной концентрацией и при

различных температурах. После обработки образцы промывали, фотографировали и заключали в среду для заморозки с последующим получением и анализом криосрезов.

Эффективность децеллюляризации оценивали визуально по относительной прозрачности тканей на фотографиях, а также микроскопическими методами на тканевых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином. Обработка эксплантатов нервов детергентами по тестируемой методике сопровождалась просветлением тканей в различной степени, вероятно, вследствие удаления клеток и миелиновых волокон. Протокол сравнения обеспечивал более глубокую степень децеллюляризации, что, однако достигалось при более продолжительном действии детергентов и частичной дезорганизацией каркаса матрикса. Результаты свидетельствуют о перспективности применения производных сополимеров этиленоксида и пропиленоксида для ускоренной и мягкой децеллюляризации периферических нервов, однако, практическое применение методики требует дальнейшей оптимизации условий для более эффективного удаления клеточных компонентов.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности (проект FZSM-2022-0020).

Список литературы

1. Zhang X., Chen X., Hong H., et al. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering // *Bioactive Mater.* 2022. Vol. 10. P. 15–31. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.09.014
2. Sondell M., Lundborg G., Kanje M. Regeneration of the rat sciatic nerve into allografts made acellular through chemical extraction // *Brain Res.* 1998. Vol. 795, N 1–2. P. 44–54. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00251-0

Жданов Д.Д.¹ ✉, Блинова В.Г.¹, Гладилина Ю.А.¹, Шишпарёнок А.Н.¹, Абрамова А.А.^{1,2}, Елисеева Д.Д.²

Модуляция альтернативного сплайсинга FoxP3 переключающими сплайсинг олигонуклеотидами для индукции пролиферации и супрессорной активности регуляторных Т-клеток пациентов с аутоиммунными заболеваниями

¹ НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

² Научный центр неврологии, Москва, Россия

✉ zhdanovdd@mail.ru

Аннотация. Профиль сплайс-вариантов FoxP3 в регуляторных Т-клетках (Трег) пациентов с аутоиммунными заболеваниями отличается от здоровых доноров. Переключающие сплайсинг олигонуклеотиды избирательно индуцируют полноразмерный сплайс-вариант, что приводит к увеличению пролиферации и супрессорной активности.

Ключевые слова: регуляторные Т-клетки; альтернативный сплайсинг; переключающие сплайсинг олигонуклеотиды; FoxP3; рассеянный склероз; болезнь Шегрена; боковой амиотрофический склероз.

Zhdanov D.D.¹, Blinova V.G.¹, Gladilina Yu.A.¹, Shishparenok A.N.¹, Abramov A.A.^{1,2}, Eliseeva D.D.²

Modulation of FoxP3 alternative splicing by splice-switch oligonucleotides for induction of proliferation and suppressor activity of regulatory T cells from patients with autoimmune diseases

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Abstract. The profile of FoxP3 splice variants in regulatory T cells (Treg) of patients with autoimmune diseases differs from healthy donors. Splicing-switching oligonucleotides selectively induce the full-length splice variant, which leads to increased proliferation and suppressor activity.

Keywords: regulatory T cells; alternative splicing; splicing-switching oligonucleotide; FoxP3; multiple sclerosis; Sjögren's disease; amyotrophic lateral sclerosis.

Альтернативный сплайсинг (АС), это вариант сплайсинга матричных РНК (мРНК), при котором в ходе экспрессии гена на основе одного и того же первичного транскрипта (пре-мРНК) образуются нескольких видов зрелых мРНК. АС подвергается пре-мРНК транскрипционного фактора FoxP3. Этот белок регулирует дифференцировку, созревание, а также интенсивность пролиферации и супрессорную активность регуляторных Т-клеток (Трег). У больных некоторыми аутоиммунными заболеваниями выявлено снижение количества Трег и/или нарушение их способности супрессировать аутоактивированные лимфоциты [1]. Причины, по которым развиваются данные отклонения не изучены в полной мере. Описаны четыре изоформы белка FoxP3, образующихся в результате АС его пре-мРНК: полноразмерный вариант, варианты с делецией каждого из экзонов 2 или 7, а также с делецией обоих экзонов.

Мы обнаружили, что в Трег периферической крови пациентов аутоиммунными заболеваниями профиль сплайс-вариантов FoxP3 отличается от профиля в Трег здоровых доноров. У здоровых доноров преобладал полноразмерный вариант. У пациентов с рассеянным склерозом (РС) или боковым амиотрофическим склерозом (БАС) преобладал вариант с делецией экзона 2, в то время как у пациентов с болезнью Шегрена (БШ) доминирующим вариантом был таковой с делецией экзона 7.

Из крови пациентов с БАС выделены Трег и культивированы *ex vivo* до терапевтических количеств. После культивирования Трег были трансфицированы переключающими сплайсинг олигонуклеотидами (ПСО) для индукции синтеза полноразмерного сплайс-варианта FoxP3. ПСО комплиментарны регуляторным последовательностям на цепи пре-мРНК FoxP3 (сайтам взаимодействия с регулирующими сплайсинг SR-белками). Таким образом осуществлена модуляция включения экзона 2 и экзона 7 в мРНК FoxP3 и синтез полноразмерного сплайс-варианта этого белка [2]. Полученные клетки, по сравнению с контрольными, показали в три раза большую супрессорную активность, т.е. способность ингибировать аутологичные таргетные эффекторные CD4⁺CD25⁻ Т-лимфоциты. Пролиферативная активность, таких клеток была выше в 2 раза. Клетки синтезировали супрессорные цитокины, гранзимы и рецепторы более интенсивно, по сравнению с контрольными клетками [3]. Таким образом, стратегия увеличения супрессорной активности Трег при помощи переключающих сплайсинг олигонуклеотидов применима к аутологичным Трег пациентов с БАС.

Нами создан прототип персонализированного клеточного терапевтического препарата для регенеративной терапии аутоиммунных заболеваний (прежде всего БАС), патогенез которых связан с недостаточностью Трег.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00326, <https://rscf.ru/project/23-24-00326/>

Список литературы

1. Blinova V.G., Vasilyev V.I., Rodionova E.B., Zhdanov D.D. The Role of regulatory t cells in the onset and progression of primary Sjögren's syndrome // *Cells*. 2023. Vol. 12, N 10. ID 1359. doi: 10.3390/cells12101359
2. Blinova V.G., Gladilina Y.A., Abramova A.A., et al. Modulation of suppressive activity and proliferation of human regulatory T cells by splice-switching oligonucleotides targeting FoxP3 Pre-mRNA // *Cells*. 2024. Vol. 13, N 1. ID 77. doi: 10.3390/cells13010077
3. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Blinova V.G., et al. Induction of FoxP3 Pre-mRNA alternative splicing to enhance the suppressive activity of regulatory T cells from amyotrophic lateral sclerosis patients // *Biomedicines*. 2024. Vol. 12, N 5. ID 1022. doi: 10.3390/biomedicines12051022

Жоламанова С.Ж.¹ ✉, Ступникова Т.В.¹, Бекназар А.Н.¹, Оразалы А.Б.¹, Савельева А.Е.²

Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток при расстройстве аутистического спектра

¹ ТОО «Московский центр клеточных технологий», Алматы, Республика Казахстан

² ФГБОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, Москва, Россия

✉ saule_94@bk.ru

Аннотация. Расстройство аутистического спектра (РАС) — гетерогенные нарушения нервного развития, его симптомы начинают проявляться в раннем возрасте. Мезенхимальные стволовые клетки обладают нейрорепропротективной активностью, их регенеративные свойства позволяют стать им перспективными кандидатами в лечении РАС.

Ключевые слова: расстройство аутистического спектра; клеточная терапия; регенеративная медицина; мезенхимальные стволовые клетки.

Zholamanova S.Zh.¹, Stupnikova T.V.¹, Beknazar A.N.¹, Orazaly A.B.¹, Saveleva A.E.²

Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in autism spectrum disorder

¹ LLP “Moscow Center of Cell Technologies”, Almaty, Republic of Kazakhstan

² FSBEI HE “ROSUNIMED” of MOH of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Autism Spectrum Disorders (ASD) are a group of heterogeneous neurodevelopmental conditions that symptoms begin to appear at an early age. Mesenchymal stem cells have neuroprotective activity and their regenerative properties make them promising candidates for the treatment of ASD.

Keywords: autism spectrum disorder; cell therapy; regenerative medicine; mesenchymal stem cells.

Расстройства аутистического спектра (РАС) — широко распространенные нейробиологические расстройства, характеризующиеся трудностями в социальном общении, повторяющимся поведением и ограниченностью интересов, которые начинаются в раннем возрасте. Эпилепсия, нервные тики, синдром дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) и самоповреждающее поведение могут быть связаны с РАС [1].

Информированность общественности и врачей о РАС за последние десятилетия заметно возросла благодаря расширению средств массовой информации и интенсивности исследований, публикуемых в научных журналах. Согласно данным 2023 года Всемирной организации здравоохранения, в мировом масштабе РАС присутствует примерно у 1 ребенка из 100 [2].

Распространенность РАС растет с опасной скоростью, при этом эффективных и однозначных фармакологических вариантов не хватает. Необходимость поиска методов лечения прокладывает путь для такой области регенеративной медицины, как клеточная терапия. В последнее время особое внимание обращают на причину иммунной патологии в головном мозге у людей с РАС. В связи с этим, терапевтические свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с точки зрения иммуномодуляции логичны и их применение становится многообещающим методом лечения РАС [3].

МСК представляют собой гетерогенную группу мультипотентных самообновляющихся клеток с широким потенциалом дифференцировки, обладающих иммуномодулирующими способностями, секретирующих различные цитокины, факторы роста и молекулы внеклеточного матрикса, которые играют роль в регуляции гемопоэза, ангиогенеза, иммунных и воспалительных реакциях. МСК экспрессируют молекулы главного

комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, что приводит к низкой иммуногенности и позволяет проводить аллогенную инфузию.

Также было показано, что МСК уменьшают нейровоспаление, обеспечивают нейропротекцию и усиливают синаптическую функцию, что также делает их привлекательными кандидатами для лечения РАС [4].

В клинике «Московский центр клеточных технологий» с февраля 2023 года по май 2024 года под наблюдением и лечением находятся 54 ребенка с РАС. Средний возраст пациентов 8,5 лет (от 3,3 до 19,5 лет). Из них 13 (24%) — девочек, 41 (76%) — мальчиков. У троих из них (1 — ж, 2 — м) помимо основного диагноза имеется сопутствующее заболевание — эпилепсия. Пациентам было рекомендовано трехкратное количество введений, с промежутком между ними ~2 месяца. МСК вводили внутривенно в количестве 2×10^6 МСК/кг веса, с процентом жизнеспособных МСК не менее 90%.

Родители пациентов после клеточной терапии в разной степени выраженности наблюдали: появление новых навыков (опрятности и прочее), изменение эмоционального поведения, попытки выстраивания коммуникативных отношений, проявление интереса к сверстникам, визуализацию речи жестами, изменение пищевых привычек/предпочтений, уменьшение стимов, смысловое понятие речи, нормализацию ЖКТ, проявление тактильной коммуникации и попыток зрительного контакта. Родители двоих пациентов с эпилепсией в качестве сопутствующего диагноза отметили снижение частоты приступов. Эффект от клеточной терапии — сугубо индивидуальная реакция каждого пациента, субъективные положительные изменения родственники некоторых пациентов начинали отмечать с 7-го дня после первого введения МСК, других — через полгода после прохождения курса.

В ходе внутривенного введения МСК и за весь период наблюдений побочных эффектов, связанных с клеточной терапией, отмечено не было. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о потенциально перспективной роли МСК в терапии РАС.

Список литературы

1. Makoto N., Takeo M., Akihiko T. Cell therapies for autism spectrum disorder based on new pathophysiology: A review // *Cell Transplant.* 2023. Vol. 32. ID 09636897231163217. doi: 10.1177/09636897231163217
2. who.int [Электронный ресурс]. Мрор: information on the outbreak. Режим доступа: <https://www.who.int/>
3. Nabetani M., Mukai T. Future perspectives on cell therapy for autism spectrum disorder // *BIOCELL.* 2022. Vol. 46, N 4. P. 873–879. doi: 10.32604/biocell.2022.018218
4. Sun J.M., Dawson G., Franz L., et al Infusion of human umbilical cord tissue mesenchymal stromal cells in children with autism spectrum disorder // *Stem Cells Transl Med.* 2020. Vol. 9, N 10. P. 1137–1146. doi: 10.1002/sctm.19-0434

Жукова М.А.¹, Ермакова Н.Н.¹, Пан Э.С.¹, Дыгай А.М.^{1,2}, Скурихин Е.Г.¹ ✉

Ингибирование MAPK/ERK и PD-1 для борьбы с истощением и повышения цитотоксичности CD8⁺ Т-клеток: разработка нового подхода терапии рака легкого

¹ ФГБНУ «НИИОПП», Москва, Россия

² ФГБНУ «ТНИМЦ» НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга, Томск, Россия

✉ eskurihin@inbox.ru

Аннотация. Разработан подход репрограммирования CD8⁺ Т-лимфоцитов, заключающийся в ингибировании пути MAPK/ERK и PD-1, а также «обучении» антигенами стволовых опухолевых клеток. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* выявлены противоопухолевый и антиметастатический эффекты репрограммированных CD8⁺ Т-лимфоцитов.

Ключевые слова: MAPK/ERK; PD-1/PD-L1; рак легкого; стволовые опухолевые клетки; клеточная терапия; репрограммированные CD8⁺ Т-лимфоциты; противоопухолевая активность; антиметастатическая активность.

Zhukova M.¹, Ermakova N.¹, Pan E.¹, Dygai A.^{1,2}, Skurikhin E.¹

Inhibition of MEK/ERK and PD-1 to combat exhaustion and increase cytotoxicity of CD8⁺ T cells: development of a new approach to lung cancer therapy

¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

² Goldberg ED Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. An approach to reprogramming CD8⁺ T-cells has been developed, which consists of inhibiting the MAPK/ERK and PD-1 pathways, as well as “training” by cancer stem cells’ antigens. *In vivo* and *in vitro* experiments have shown the antitumor and antimetastatic effects of reprogrammed CD8⁺ T cells.

Keywords: MAPK/ERK; PD-1/PD-L1; lung cancer; cancer stem cells; cell therapy; reprogrammed CD8⁺ T-cells; antitumor activity; antimetastatic activity.

Рак легкого является основной причиной смерти от рака среди мужчин и женщин. Значительные успехи в лечении рака легкого были достигнуты с началом применения средств таргетной терапии и ингибиторов контрольных точек [1]. Однако некоторые формы рака легкого, например мелкоклеточный рак легкого (МКРЛ), остаются устойчивыми к лечению.

Цитотоксические CD8⁺ Т-лимфоциты являются основными эффекторными клетками иммунного ответа, играющими ключевую роль в противоопухолевом иммунитете. CD8⁺ Т-лимфоциты вызывают гибель опухолевых клеток, продуцируя цитотоксические молекулы, такие как перфорин и гранзимы [2]. Кроме того, интерферон- γ , секретируемый CD8⁺ Т-лимфоцитами, усиливает противоопухолевые свойства других иммунных клеток [3]. Опухоль и ее микроокружение подавляют пролиферацию CD8⁺ Т-лимфоцитов и снижают их количество [4]. При взаимодействии с опухолью наблюдается снижение активности метаболических путей и гипореактивные фенотипы CD8⁺ Т-лимфоцитов [5].

В настоящем исследовании мы оценили возможность репрограммировать CD8⁺ Т-лимфоциты лабораторных животных и человека ингибированием пути MAPK/ERK с помощью MEK1/2i; при этом ингибитором иммунных контрольных точек нивалумабом был заблокирован сигнальный путь PD/PDL-1, что защищало

T-лимфоциты от иммунодепрессивного действия опухоли. Для целевой элиминации мишени (стволовых опухолевых клеток, СОК) репрограммированные CD8⁺ T-лимфоциты (pCD8T) были обработаны лизатом СОК. Кроме того, на различных моделях рака легкого (*in vitro* и *in vivo*) изучены противоопухолевые, антиметастические эффекты pCD8T мышей и человека.

В результате репрограммирования «наивных» CD8⁺ T-лимфоцитов костного мозга и селезенки мышей линии C57BL/6 возраста 8–10 недель нами получены популяции клеток со стойкой экспрессией CCR7, высокой выживаемостью в культуре клеток карциномы легких Льюис (LLC) и высокой цитотоксичностью в отношении опухолевых клеток. Клеточная терапия костномозговыми и селезеночными pCD8T препятствовала росту опухоли в легких и процессу метастазирования у мышей C57BL/6 в условиях ортотопической и метастатической LLC, при этом имело место увеличение количества цитотоксических T-лимфоцитов в легких и крови. Противоопухолевый и антиметастический эффекты обусловлены элиминацией циркулирующих опухолевых клеток и СОК. Кроме того, pCD8T нарушают рекрутирование клеток неоваскулогенеза в легкие. Сочетание двух механизмов противоопухолевой активности у pCD8T может быть полезным в разработке эффективного подхода терапии рака легкого.

Нами показана принципиальная возможность репрограммирования CD8⁺T-лимфоцитов крови человека с использованием ингибитора MEK1/2 и блокатора PD-1/PDL-1, и целевым «обучением» антигенами СОК пациента с МКРЛ. MEK1 стратегия репрограммирования применима для клеток здорового добровольца, пациентов с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), астмой, МКРЛ, а также пациентов с сочетанием МКРЛ и ХОБЛ. В экспериментах *in vitro* продемонстрировано, что мишенью для pCD8⁺T здорового добровольца и пациентов с заболеваниями легких являются СОК.

Предложенный нами способ репрограммирования путем ингибирования сигнальных путей MAPK/ERK и PD-1/PDL-1 и «целевым» обучением клетками опухоли может быть полезным в разработке эффективного подхода терапии рака легкого, так как позволяет получить аутологичные и аллогенные pCD8T для таргетного и персонализированного лечения МКРЛ. Для контроля эффективности клеточной терапии обязателен мониторинг СОК крови пациента с анализом CD8⁺ T-лимфоцитов на предмет истощения.

Список литературы

1. Ortega-Franco A., Calvo V., Franco F., et al. Integrating immune checkpoint inhibitors and targeted therapies in the treatment of early stage non-small cell lung cancer: a narrative review // *Transl Lung Cancer Res*. 2020. Vol. 9, N 6. P. 2656–2673. doi: 10.21037/tlcr-20-546
2. Cao X., Cai S.F., Fehniger T.A., et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance // *Immunity*. 2007. Vol. 27, N 4. P. 635–646. doi: 10.1016/j.immuni.2007.08.014
3. Tsukumo S.-I., Yasutomo K. Regulation of CD8⁺ T cells and antitumor immunity by notch signaling // *Front Immunol*. 2018. Vol. 9. ID 101. doi: 10.3389/fimmu.2018.00101
4. Sathaliyawala T., Kubota M., Yudanin N., et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets // *Immunity*. 2013. Vol. 38, N 1. P. 187–197. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.020.
5. Gattinoni L., Speiser D.E., Lichterfeld M., Bonini C. T memory stem cells in health and disease // *Nat Med*. 2017. Vol. 23, N 1. P. 18–27. doi: 10.1038/nm.4241

Жукова О.А.¹ ✉, Басманов Д.В.², Прусаков К.А.², Столяров В.Ю.², Колесов В.В.³, Горбачев И.А.³,
Кузнецова И.Е.³, Сидорук К.В.⁴, Богуш В.Г.⁴, Зыков К.А.¹, Баклаушев В.П.^{1,5,6}

Разработка *in vitro* микрофлюидного устройства «легкое-на-чипе»

¹ ФГБУ «НИИ пульмонологии» ФМБА России, Москва, Россия

² ФНКЦ физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

³ ФГБУН Институт радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН, Москва, Россия

⁴ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁵ ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи ФМБА России, Москва, Россия

⁶ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

✉ oksana.saprikina82@mail.ru

Аннотация. Экспериментальным путем показана возможность моделирования альвеолярного тканеклеточного интерфейса *in vitro* путем создания прототипа биоинженерного устройства «легкое-на-чипе», включая интерфейс воздух–жидкость, для исследований сложного взаимодействия между клетками и окружающей средой.

Ключевые слова: микрофлюидика; «легкое-на чипе»; гемато-альвеолярный барьер; PDMS; рекомбинантный спидроин.

Zhukova O.A.¹, Basmanov D.V.², Prusakov K.A.², Stolyarov V.Yu.², Kolesov V.V.³, Gorbachev I.A.³,
Kuznetsova I.E.³, Sidoruk K.V.⁴, Bogush V.G.⁴, Zykov K.A.¹, Baklaushev V.P.^{1,5,6}

In vitro development of a lung-on-a-chip microfluidic device

¹ Federal Pulmonology Research Institute, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Kotelnikov Institute of Radio Engineering and Electronics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

⁵ Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies FMBA of Russia, Moscow, Russia

⁶ Federal state budgetary institution «Federal center of brain research and neurotechnologies» FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. The possibility of modeling the alveolar tissue-cell interface *in vitro* by creating a prototype of a bioengineered lung-on-a-chip device, including an air-liquid interface, for studying the complex interaction between cells and the environment has been demonstrated experimentally.

Keywords: microfluidics; lung-on-a-chip; blood-alveolar barrier; PDMS; recombinant spidroin.

Болезни органов дыхания представляют собой серьезную медико-социальную проблему, влияющую на качество жизни и занимают одно из ведущих мест в смертности населения. Важным условием для исследований патофизиологии гемато-альвеолярного барьера и скрининга новых препаратов является разработка *in vitro* адекватной модели альвеолы, которую невозможно воспроизвести ни в 2D, ни в 3D-культурах. Значимым физиологическим фактором в альвеоле является растяжение её стенок. Нарушение растяжения и спадания альвеол является важным патофизиологическим фактором развития отёка лёгкого и других ключевых механизмов развития патологии лёгких, в связи с чем важнейшим требованием к биоматериалу для создания микрофлюидного устройства, воспроизводящего гемато-альвеолярный барьер, помимо биосовместимости, является эластичность. Первичный прототип микрофлюидной ячейки был разработан нами с помощью аддитивных технологий на основе материала из фотополимерной смолы. Корпус ячейки состоял из верхней и нижней части, содержащих микрофлюидные каналы, и центральной части для культивирования клеток. Верхние микроканалы можно использовать при культивировании клеток альвеолярного эпителия,

формируя границу раздела воздух–жидкость для имитации альвеол за счет подачи кислорода; нижние — используются для культивирования эндотелиоцитов и непрерывной перфузии культуральной жидкости, моделируя капиллярные каналы. В центральной камере верхние и нижнемикрофлюидные каналы сообщаются через пористую полупроницаемую мембрану, имитирующую альвеолярные перегородки. Важным требованием к «легкому-на-чипе» является возможность проведения не только трансальвеолярных измерений, но и измерение более тонких изменений параметров клеточного слоя, характеризующих степень воздействия на него различных агентов, например, измерение трансэпителиального и трансэндотелиального сопротивления клеток. Система совместима также с рядом стандартных методов лабораторного и химического анализа, включая световую и электронную микроскопию, иммунохимические и молекулярно-генетические методы, а также с физическими методами исследования уровней кислорода, температуры и биомаркеров. Были изготовлены два вида мембран: получаемая с помощью электроспиннинга из смеси рекомбинантных спидроинов rS1/9 и rS2/12 с добавлением этого же белка, модифицированного рекомбинантной тирозиназой для перевода остатков тирозина в дигидроксифенилаланин (ДОФА) с целью повышения адгезионных свойств, и мембрана из полидиметилсилоксана (PDMS). Мембраны обладали важными биофизическими параметрами, такими как пористость, эластичность, толщина от 10 мкм, что необходимо для моделирования дыхательной мембраны. На них были проведены сравнительные эксперименты по иммобилизации модельных эндотелиоцитов пупочной вены (HUVEC) и эпителиоцитов (Caco-2) для формирования, соответственно, сосудистого и альвеолярного компонентов микрофлюидного устройства. Мембраны из рекомбинантных спидроинов обладали выраженными адгезивными свойствами, но недостаточной оптической прозрачностью, необходимой при оптической микроскопии процессов на всех этапах исследования. Мембраны PDMS продемонстрировали хорошую оптическую прозрачность, однако не обладали достаточной способностью к адгезии клеток, в связи с чем было проведено их дополнительное покрытие желатином, geltrex и рекомбинантным спидроином rS1/9 с последующим культивированием на них клеток HUVEC и Caco-2. Наилучшие адгезивные характеристики с образованием конфлюэнтного монослоя продемонстрировали мембраны, покрытые рекомбинантным спидроином. В результате был разработан прототип микрофлюидной ячейки «легкое-на-чипе» с каркасом из PDMS и мембраной из PDMS, покрытой рекомбинантным спидроином rS1/9, и проведены испытания по совместному культивированию клеток HUVEC и Caco-2. С использованием методов циклической вольтамперометрии и импедансометрии было проведено измерение трансэпителиального и трансэндотелиального сопротивления клеток, что позволило сделать выводы о влиянии на целостность клеточного слоя токсических агентов, находящихся в окружающей клетку среде. На основании полученных результатов сделаны практические выводы в пользу применения полимера PDMS для производства каркаса микрофлюидного устройства и мембраны из PDMS с покрытием рекомбинантным спидроином rS1/9 для культивирования альвеолярных и эндотелиальных клеток «легкого-на-чипе». Результаты эксперимента показали возможность моделирования альвеолярно-капиллярного интерфейса *in vitro* с воспроизведением ключевых особенностей дыхательных путей и для исследования сложного взаимодействия клеток с окружающей средой. В дальнейшем будет создано биоинженерное устройство «легкое-на-чипе» на основе микрофлюидных и акустоэлектронных технологий для решения большого количества фундаментальных и прикладных задач.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ФМБА России, а также в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Забокрицкий Н.А.

Новое биосоединение и экспериментальная оценка его регенеративных свойств

Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, Екатеринбург, Россия

✉ pharmusma@rambler.ru

Аннотация. Биосоединения на основе консорциума метаболитов пробиотических штаммов сенной палочки 59Т и 60Т обладает выраженным цитопротекторным и регенерирующим эффектами, является перспективным лекарственным кандидатом для разработки и создания нового фармакологического класса гепатопротекторных препаратов.

Ключевые слова: биосоединение; метаболиты гепатоциты; гепатопротектор; цитопротекция; регенерация.

Zabokritskiy N.A.

The new bio-compound and an experimental assessment of its regenerative properties

Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia

Abstract. Biocompounds based on the consortium of metabolites of probiotic strains of bacillus subtilis 59T and 60T have pronounced cytoprotective and regenerating effects. These are a promising drug candidate for the development and creation of a new pharmacological class of hepatoprotective drugs.

Keywords: biocompound; hepatocyte metabolites; hepatoprotector; cytoprotection; regeneration.

На сегодняшний день отечественные и зарубежные ученые сходятся во мнении, что весьма перспективными новыми лекарственными кандидатами в области создания противомикробных и иммунобиологических препаратов свойств являются пробиотики [1, 2, 4]. Тем не менее в других фармакологических группах существенных потенциал пробиотических препаратов считается далеко нераскрытым [2, 4]. Весьма перспективным считается и новая группа — метабиотики [2, 3]. Основу этих препаратов представляют биологически активные вещества, продуцируемые пробиотическими клетками. В связи с этим значительный интерес представляла разработка и доклиническое изучение новых соединений на основе метабиотиков.

Объектом исследования являлось новое биосоединение на основе метаболитов, продуцируемых пробиотическими штаммами 59Т и 60Т сенной палочки, полученных методами дезинтеграции и микрофльтрации в соотношении 1:1. Рецептурную основу биосоединения составляет белково-полисахаридный комплекс (65–75%), а также цитокины, антибиотики, антибиотикоподобные вещества, ферменты (протеолитические и амилазные и др.), интерлейкины, витаминподобные вещества, аминокислоты и другие активные вещества. В проведенных ранее исследованиях было показано, что полученные метаболиты не обладают острой и хронической токсичностью, а также повышают выживаемость лабораторных животных при воспроизведении экспериментальной модели токсического гепатита.

Целью работы была экспериментальная оценка регенеративных свойств и цитопротекции нового биосоединения на основе консорциума метаболитов двух штаммов-пробиотиков сенной палочки в условиях токсического повреждения клеток четыреххлористым углеродом. Исследования проводили *in vitro* на изолированной культуре мышинных гепатоцитов при воздействии CCl_4 в четырех экспериментальных группах: I — биосоединение в дозе 30 мг/мл, II — биосоединение в дозе 15 мг/мл, III — биосоединение в дозе 7,5 мг/мл, IV — контроль (без биосоединения). Прежде всего определяли минимальную токсическую дозу исследуемого биосоединения (0,3%) и четыреххлористого углерода по отношению к клеточной линии

(0,5 нг/мл⁻¹). Далее, на воспроизведенной модели токсического повреждения клеточной линии гепатоцитов дана экспериментальная оценка цитопротективному и регенеративному эффектам изучаемого биосоединения. Так, выживаемость клеток составила 79,2–81,5% по сравнению с контролем. Кроме того, по истечении 96 часов установлено на 18,9–21,4% снижение пролиферативной активности культуры клеток относительно контроля (без применения биосоединения). При этом наблюдали снижение митотического индекса в 1,8–1,9 раза по сравнению с контролем.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что клеточная культура выделенных гепатоцитов использованием исследуемого биосоединения значительно более устойчивая к воздействию четыреххлористого углерода. Кроме того, установлено, что исследуемое биосоединение обладает выраженным положительным цитопротекторным и регенерирующим эффектами. Все это позволяет сделать заключение, что предлагаемое биосоединение на основе консорциума метаболитов пробиотических штаммов сенной палочки является перспективным лекарственным кандидатом для разработки и создания нового фармакологического класса гепатопротекторных препаратов.

Работа выполнена по теме из Плана НИР ИИФ УрО РАН, № гос. регистрации 122020900136-4.

Список литературы

1. Забокрицкий Н.А. Принципиальные направления научных исследований по обоснованию и разработке новых иммунобиологических препаратов // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2018. Т. 81, № 5. С. 85–86. EDN: KPXIBF doi: 10.30906/0869-2092-2018-81-5s-1-306
2. Забокрицкий Н.А., Сарапульцев П.А. Экспериментальное обоснование возможности создания нового метаболитического препарата // Российский иммунологический журнал. 2018. Т. 12, № 3. С. 295–300. EDN: YUCPJJ doi: 10.31857/S102872210002398-2
3. Забокрицкий Н.А. Фармакологическая оценка иммуностропной активности нового гелевого метаболита на факторы клеточного и гуморального иммунитета при экспериментальном моделировании термических ожогов кожи // Российский иммунологический журнал. 2020. Т. 23, № 2. С. 125–132. EDN: NPGMQA doi: 10.46235/1028-7221-314-PA0
4. Lee N.-K., Paik H.-D., Kim W.-S. Bacillus strains as human probiotics: characterization, safety, microbiome, and probiotic carrier // Food Sci Biotechnol. 2019. Vol. 28, N 5. P. 1297–1305. doi: 10.1007/s10068-019-00691-9

Завьялов А.О.¹ ✉, Астрелина Т.А.¹, Усупжанова Д.Ю.¹, Брунчуков В.А.¹, Меркулов М.В.¹, Маливанова Т.Ф.¹, Кобзева И.В.¹, Сучкова Ю.Б.¹, Булычева Ю.И.¹, Никитина В.А.¹, Михадаркина О.Г.¹, Дубова Е.А.¹, Лищук С.В.¹, Цимахович А.О.², Серова О.Ф.², Самойлов А.С.¹

Сравнение применения раневых покрытий из внеклеточного матрикса амниотической оболочки при химических ожогах

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ МО Московский областной перинатальный центр, Балашиха, Россия

✉ antonzavyal@yandex.ru

Аннотация. Сравнение терапевтической эффективности раневых покрытий из ВКМ амниотической оболочки, полученных по двум различным протоколам децеллюляризации. SDS-протокол обеспечивает более эффективную очистку от клеточного материала, но снижает регенеративный потенциал ВКМ по сравнению с NaOH-протоколом.

Ключевые слова: децеллюляризация; внеклеточный матрикс; амниотическая оболочка; химические ожоги.

Zavyalov A.O.¹, Astrelina T.A.¹, Usupzhanova D.Yu.¹, Brunchukov V.A.¹, Merkulov M.V.¹, Malivanova T.F.¹, Kobzeva I.V.¹, Suchkova Yu.B.¹, Bulycheva Yu.I.¹, Nikitina V.A.¹, Mikhadarkina O.G.¹, Dubova E.A.¹, Lischuk S.V.¹, Tsimakhovich A.O.², Serova O.F.², Samoilov A.S.¹

Comparison of the use of wound dressings from the amniotic membrane extracellular matrix in chemical burns

¹ State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Moscow Regional Perinatal Center, Balashikha, Moscow Region, Russia

Abstract. Comparison of the therapeutic efficacy of wound cover from the amniotic membrane obtained by using two different decellularization protocols. The SDS-protocol provides a more efficient purification from cellular material, but reduces the regenerative potential of ECM compared to the NaOH-protocol.

Keywords: decellularization; extracellular matrix; amniotic membrane; chemical burns.

Для лечения поверхностных ожоговых травм широко применяют разнообразные покрытия с определенными физическими и биологическими свойствами. Децеллюляризованные внеклеточные матриксы обладают тканеспецифичной структурой и служат физическим каркасом для клеток-резидентов, обеспечивая их сигнальными молекулами, необходимыми для поддержания клеточного гомеостаза и адгезии [1]. Одним из наиболее доступных источников ВКМ являются ткани плаценты человека. Важное значение имеет подбор оптимального протокола децеллюляризации тканей, позволяющего сохранить регенеративный потенциал и обеспечить низкую иммуногенность получаемого ВКМ.

В представленной работе была произведена оценка эффективности применения раневых покрытий из ВКМ амниотической оболочки, полученных согласно двум различным протоколам децеллюляризации. Обработка плаценты включала следующие этапы: выделение амниона от тканей плаценты, отмывка дистиллированной водой, деконтаминация в 0,9% р-ре NaCl с добавлением антибиотиков в течение 24 ч, криоконсервация при -80°C и хранение до этапа децеллюляризации. Децеллюляризация амниотических оболочек осуществлялась согласно двум протоколам: SDS-протоколу и NaOH-протоколу [2, 3].

SDS-протокол включал в себя последовательную обработку растворами додецилсульфата натрия (SDS) разной концентрации: 0,1% р-ром в течение 12 ч, 0,5% р-ром в течение 12 ч, 1% р-ром в течение 6 часов; обработку 0,5% р-ром Triton-X100 в течение 2 ч, однократное промывание 0,1M р-ром NaOH и трехкратное

отмывание в р-ре фосфатно-солевого буфера (1xPBS) с пенициллином-стрептомицином (250 мкг/мл) в течение 30 мин, затем проводилась УФ-стерилизация в течение 15 мин.

NaOH-протокол включал в себя инкубацию тканей в 0,2% р-ре ЭДТА в течение 30 минут, обработку 0,5M р-ром NaOH в течение 30 секунд с последующей нейтрализацией 5% р-ром NH₄Cl, трехкратным отмыванием в р-ре 1xPBS с пенициллином-стрептомицином (250 мкг/мл) и УФ-стерилизацию в течение 15 мин.

Оценка качества получаемых ВКМ осуществлялась путем гистологического анализа (окрашивание гематоксилином и эозином), иммуногистохимических исследований (ИГХ), а также методом флуоресцентной микроскопии (BioTek, США) с предварительным окрашиванием интеркалирующим красителем DAPI (Sigma Aldrich, США). Было показано, что SDS-протокол обеспечивает наиболее высокую степень очистки ВКМ от остаточного клеточного и ядерного материала. При этом, согласно результатам ИГХ исследований, ВКМ, полученный согласно NaOH-протоколу, демонстрировал более широкий спектр функционально значимых белковых компонентов: коллагена I, III, IV, VI типов и гликопротеинов: ламинин, эластин, фибронектин.

В исследование оценки эффективности применения полученных раневых покрытий из ВКМ были включены 9 белых крыс-самцов линии Wistar. Химический ожог моделировали путем наложения ткани размером 2×2 см, пропитанной 50% трифторуксусной, на спину животного в течение 20 сек. Животные были разделены на 3 группы: контрольная и две опытные (терапия на 14 день).

Планиметрические исследования показали, что на 42 сутки общая площадь раневой поверхности в группе крыс, получавших лечение в виде ВКМ по NaOH-протоколу, была достоверно меньше в сравнении с группой контроля ($0,96 \pm 0,32$ см² и $2,03 \pm 0,26$ см² соответственно, $p = 0,01$). Гистологическая оценка на 42 день наблюдения также показала, что группа ВКМ по NaOH-протоколу демонстрирует наилучшие результаты по трем из четырех оцениваемых параметров: количеству зачатков волосяных фолликулов, толщине зоны фиброза, наличию воспалительной инфильтрации в глубоких слоях дермы. Таким образом, получение ВКМ по более длительному (около 2-х суток) SDS-протоколу приводит к наиболее эффективной элиминации остаточных клеточных компонентов и снижению регенеративного потенциала по сравнению с NaOH-протоколом. Вероятно, это связано с утратой ВКМ компонентов, важных для эффективной регенерации ожоговой раны: коллагена III и IV типа, а также ламинина и эластина.

Список литературы

1. Исаева Е.В., Бекетов Е.Е., Аргучинская Н.В., и др. Децеллюляризованный внеклеточный матрикс для тканевой инженерии (обзор) // Современные технологии в медицине. 2022. Т. 14, № 3. С. 57–69. EDN: ZXIYSU doi: 10.17691/stm2022.14.3.07
2. Khosravimelal S., Momeni M., Gholipur M., et al. Protocols for decellularization of human amniotic membrane // Methods Cell Biol. 2020. Vol. 157. P. 37–47. doi: 10.1016/bs.mcb.2019.11.004
3. Lakkireddy C., Vishwakarma S.K., Raju N., et al. Fabrication of decellularized amnion and chorion scaffolds to develop bioengineered cell-laden constructs // Cell Mol Bioeng. 2021. Vol. 15, N 1. P. 137–150. doi: 10.1007/s12195-021-00707-7

Загоскин Ю.Д.¹ ✉, Токаев Т.К.², Синицын М.В.², Григорьев Т.Е.^{1,3}, Чвалун С.Н.^{1,4}

Пористые полимерные каркасы с импрегнированными противотуберкулезными средствами для торакальной хирургии

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний Минздрава России, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский университет «Московский физико-технический институт», Московская область, Россия

⁴ Институт синтетических полимерных материалов им. А.Н. Ениколопова РАН, Москва, Россия

✉ zagos@inbox.ru

Аннотация. Разработаны композиционные пористые каркасы типа «ядро–оболочка» с гидрофобным ядром и гидрофильной оболочкой с включенными противотуберкулезными препаратами для операций экстраплеврального пневмолиза в торакальной хирургии.

Ключевые слова: пористые материалы; скаффолды; туберкулез; противотуберкулезные препараты; экстраплевральный пневмолиз; торакальная хирургия.

Zagoskin Yu.D.¹, Tokaev T.K.², Sinitsyn M.V.², Grigoriev T.E.^{1,3}, Chvalun S.N.^{1,4}

Porous polymer scaffolds impregnated with anti-tuberculosis agents for thoracic surgery

¹ National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Moscow Institute of Physics and Technology, National Research University, Moscow Region, Russia

⁴ Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials Russian, Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Composite porous scaffolds of the core-shell type with a hydrophobic core and a hydrophilic shell with included anti-tuberculosis drugs have been developed for extrapleural pneumolysis operations in thoracic surgery.

Keywords: porous materials; scaffolds; tuberculosis; anti-tuberculosis drugs; extrapleural pneumolysis; thoracic surgery.

Несмотря на стойкое снижение темпов заболеваемости и смертности от туберкулеза легких в России, проблема лечения больных с лекарственно-устойчивым туберкулезом легких остается довольно острой. Согласно статистике Минздрава на 2021 год распространённость туберкулёза легких составила 58,5 случаев на 100 000 человек. Распространённость туберкулёза с бактериовыделением 26,6%, среди которых 56,9% составляют больные с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя. При очевидном развитии методов лечения, в том числе хирургических, смертность от данного заболевания остается на достаточно высоком уровне: 4,3 на 100 000.

Известно, что эффективность коллапсохирургических методов (торакопластики) с закрытием каверны и стойким абациллированием достигает 92% [1]. При этом операция экстраплеврального пневмолиза с применением высокообъемных имплантатов, как одно из развитий коллапсохирургических методов лечения, заметно менее травматична по сравнению с торакопластикой и позволяет получить необходимый объем коллапса легкого, не приводя к косметическому дефекту грудной стенки. Ключевой трудностью, затрудняющей широкое распространение данного вида операций, является отсутствие на рынке «идеального» материала, отвечающего высоким требованиям: биосовместимость, биорезорбируемость, большой объем, низкая удельная масса, необходимые механические свойства и другие.

Ранее были разработаны объемные пористые имплантаты на основе смеси биорезорбируемых полимеров полилактида и поликапролактона, перспективные в рассматриваемой области. В экспериментах на лабораторных животных и на моделях *in vitro* была подтверждена биосовместимость и эффективность материалов. За счет относительной гидрофобности каркаса, изделия сохраняют низкую удельную плотность и не вызывают осложнений за счет давления на окружающие органы. Были подобраны состав, пористость, размер пор необходимых для сохранения требуемой прочности заданное время и для обеспечения возможности нативным тканям прорасти внутрь имплантата. На отдаленных сроках эксплантации наблюдалось формирование сосудов с практически полным замещением каркаса мягкими тканями [2, 3].

В работе предложено создание композиционных каркасов типа «ядро–оболочка» на основе разработанных ранее имплантатов, где внешний слой выполнен из пористого химически сшитого гидрофильного хитозана, для улучшения адгезии и уменьшения контактного травмирования нативных тканей при имплантации. Оболочку получали методом сублимационной сушки раствора хитозана в 1% уксусной кислоте с добавлением химического сшивателя генипин или глутаровый альдегид (1 мас.% от сух. ост.). Для улучшения эффективности лечения при использовании разработанных каркасов, предложены методики импрегнации противотуберкулезных лекарственных препаратов (ПЛП): на поверхности пористого каркаса «ядра» абсорбировали бедаквилин (4 мг/мл), линезолид (12 мг/мл), моксифлоксацин (24 мг/мл), амикацин (10 мг/мл), капреомицин (20 мг/мл), изониазид (6 мг/мл), деламанид (4 мг/мл); в «оболочку» каркасов были включены *in situ* восстановленные наночастицы серебра. Наночастицы серебра были получены восстановлением нитрата серебра раствором 1% хитозана в 1% уксусной кислоте при температуре 60°C в течение 5 суток.

Для определения эффективности проводили исследование антимикробной активности в отношении лекарственно чувствительного контрольного штамма *M. tuberculosis* H37Rv. Все препараты при толщине исследуемых образцов 5 мм и ежедневной смене элюата сохраняли противотуберкулезную активность до трех суток, за исключением деламанида. При использовании материалов большего объема (до 700 мл) предполагается увеличение периода противотуберкулезной активности за счет уменьшения скорости высвобождения препаратов из толщи изделия.

Комплексные исследования имплантатов с ПЛП при изучении гемолитического действия, цитотоксичности, раздражающего и общетоксического действия не выявили отклонений для всех препаратов, за исключением моксифлоксацина. Каркасы с препаратами отвечают требованиям безопасности, предъявляемым к медицинским изделиям. В *in vivo* исследованиях на всех имплантационных периодах признаков воспалительных изменений не установлено, объем и эффективность изделий при импрегнации препаратами сохранены.

Работа выполнена в рамках соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидии № 075-15-2023-324 от 21 февраля 2023 г.

Список литературы

1. Сабиров Ш.Ю., Нематов О.Н., Абулкасимов С.П., и др. Эффективность хирургического лечения туберкулеза легких с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя // Туберкулез и социально значимые заболевания. 2015. Т. 3. С. 65–66.
2. Токаев Т.К., Синицын М.В., Бикбаев А.С., и др. Новые биосинтетические имплантаты для хирургического лечения туберкулеза легких // Лабораторные животные для научных исследований. 2023. № 2. С. 43–52. EDN: XGXUGR doi: 10.57034/2618723X-2023 02 04
3. Демьяшкин Г.А., Токаев Т.К., Бикбаев А.С., и др. Морфофункциональная характеристика микроокружения после плевральной имплантации биосинтетических материалов // Туберкулез и болезни лёгких. 2023. Т. 101, № 1. С. 48–54. EDN: MLIWZT doi: 10.58838/2075-1230-2023-101-1-48-54

Закопайко Б.А.^{1,2}, Товпеко Д.В.³ ✉, Слизов П.А.³, Марченко Д.М.², Кондратенко А.А.³,
Александрова С.А.², Калужная Л.И.³

Исследование влияния гидролизата матрикса вартонова студня пуповины человека на мезенхимные стволовые клетки с целью дальнейшего использования его для регенерации хрящевой ткани

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ bogdanzakopayko@gmail.com

Аннотация. Исследование гидролизата матрикса вартонова студня пуповины человека по отношению к мезенхимным стволовым клеткам показало высокую степень их жизнеспособности, а также хондродифференцировку — по увеличению площади клеточных сфероидов, экспрессии генов хондрогенеза и накоплению гликозаминогликанов.

Ключевые слова: вартонов студень; гидрогель; мезенхимные стволовые клетки; сфероиды; хондрогенез.

Zakopayko B.A.^{1,2}, Tovpeko D.V.³, Slizhov P.A.³, Marchenko D.M.², Kondratenko A.A.³,
Aleksandrova S.A.², Kalyuzhnaya L.I.³

Study of the human umbilical cord wharton jelly matrix hydrolysate influence on mesenchymal stem cells for its further use in cartilage tissue repair

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

² Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

³ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study of the human umbilical cord Wharton's jelly matrix hydrolysate influence on mesenchymal stem cells showed: a high degree of cell viability, increasing of cell spheroids area, expression of chondrogenesis genes, accumulation of collagens and glycosaminoglycans.

Keywords: Wharton's jelly; hydrogel; mesenchymal stem cells; spheroids; chondrogenesis.

Гиалиновый хрящ обладает низкой способностью к регенерации, поэтому травмы или возрастные изменения закономерно приводят к развитию остеоартрита. Одной из актуальных задач регенеративной медицины является разработка эффективных препаратов для стимулирования регенерации разрушенной хрящевой ткани. Гидролизат матрикса вартонова студня (гМВС) пуповины человека является перспективным материалом для создания инъекционных форм ортобиологических препаратов. Он содержит коллагены разных типов, протеогликаны, гликозамингликаны и факторы роста, близок по структуре и составу к гиалиновому хрящу, способен к желированию. Ранее нами была разработана технология изготовления гМВС пуповины человека для внутрисуставного применения в инъекционной форме [1]. Представленная работа посвящена выявлению биологических эффектов гМВС с целью дальнейшего его использования в лечении травматических дефектов суставного хряща.

Исследование было проведено на двух линиях мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека из «Коллекции культур клеток позвоночных» ЦКП ИНЦ РАН: FetMSC — полученные из костного мозга конечности эмбриона и MSCWJ-1 — из вартонова студня пупочного канатика. Для анализа влияния гидролизата

на жизнеспособность клетки засеивали в планшеты и инкубировали в присутствии гМВС в концентрациях от 1 до 10 мг/мл в питательной среде в течение 2 сут. После этого проводили исследования по выявлению морфологии клеток методом световой микроскопии, определению количества живых/мертвых клеток — проточной цитофлуориметрией, анализу метаболической активности клеток — методом МТТ-теста и по интенсивности потребления кислорода с помощью анализатора клеточного дыхания Seahorse XFe96 (Agilent Technologies). Использованные методы не выявили значимой разницы между жизнеспособностью клеток в разных условиях и контроле. При этом был обнаружен дозозависимый эффект роста интенсивности потребления кислорода клетками линии MSCWJ-1 с увеличением концентрации гидрогеля.

Способность МСК к хондрогенной дифференцировке в присутствии гМВС была оценена несколькими методами. Первый метод заключался в анализе динамики морфометрических показателей в процессе формирования и культивирования клеточных сфероидов (КС) в течение 14 сут. Наблюдалось значимое увеличение площади КС при сохранении высокой степени округлости, активное взаимодействие клеток с гМВС и включение его фибрилл в состав КС. Далее, методом ПЦР в режиме реального времени было проведено выявление экспрессии генов, ассоциированных с хондрогенезом (Col2 α 1, Comp, Acan и Tgf- β 3). Экспрессия генов в КС через 12 сут после добавления гидролизата к питательной среде была сравнима с положительным контролем (хондрогенная среда StemPro Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco)). Для морфологического исследования 7- и 14-суточные КС заливали расплавленной агарозой, изготавливали гистологические препараты. Срезы окрашивали: гематоксилин-эозином, по Массону и альциановым синим на присутствие гликозаминогликанов (ГАГ). Наблюдалось накопление ГАГ в большей степени при использовании гМВС. Окрашивание по Массону выявило присутствие коллагеновых фибрилл в волокнах гМВС и в КС.

В результате проведенных исследований было показано, что гидролизат Вартонова студня стимулирует хондрогенную дифференцировку МСК костного мозга и пуповины человека, способствует усилению метаболической активности клеток. Исходя из полученных результатов гидролизат пуповины возможно рассматривать в качестве биостимулятора хондрогенеза для нужд регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008 «Регенераторный потенциал мультипотентных мезенхимных стромальных клеток: паракринная секреция и направленная дифференцировка».

Список литературы

1. Патент РФ на изобретение № RU 2745995C1. 2020. Калюжная-Земляная Л.И., Чернов В.Е., Чеботарев С.В., Земляной, Д.А. Возможность изготовления бесклеточного гидрогеля из вартонова студня пуповины человека для внутрисуставного применения.

Замараев А.В.^{1,2} ✉, Мамедова А.Р.^{1,2}, Копейна Г.С.^{1,2}, Животовский Б.Д.^{1–3}

Экспрессия генов, регулирующих процессы порообразования в иммуногенной гибели клеток

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

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

³ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ a-zamaraev@ya.ru

Аннотация. Экспрессия генов семейства газдерминов, MLKL и NINJ1, регулирующих процессы порообразования в иммуногенной гибели клеток, варьируется в зависимости от подтипа рака молочной железы и коррелирует с иммунным окружением.

Ключевые слова: порообразование; газдермин; иммунная система; рак молочной железы.

Zamaraev A.V.^{1,2}, Mamedova A.R.^{1,2}, Kopeina G.S.^{1,2}, Zhivotovsky B.D.^{1–3}

Expression of genes regulating pore formation processes in immunogenic cell death

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

³ Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract. Expression of the gasdermin family genes, MLKL and NINJ1, which regulate pore formation in immunogenic cell death, varies depending on the subtype of breast cancer and correlates with the immune environment.

Keywords: pore formation; GSDM; immune system; breast cancer.

На сегодняшний день в клинической онкологии считается, что оптимальные методы лечения новообразований должны не только запускать гибель злокачественных клеток, но и активировать противоопухолевый иммунный ответ пациента. На текущий момент описано более 10 различных по механизму типов программируемой гибели клеток (ПГК), таких как апоптоз, некроптоз, пироптоз, ферроптоз и др. Однако, их роль в регуляции иммунного ответа до сих пор остается малоизученной. Считается, что апоптоз является наиболее физиологическим и иммунотолерантным типом гибели, в ходе которого плазматическая мембрана остается неповрежденной до фагоцитарного удаления умирающей клетки, в то время как некроптоз и пироптоз ассоциированы с воспалением и иммуногенностью. Механистическая основа наблюдаемых отличий в иммуногенности обусловлена способностью поддерживать целостность мембраны и высвобождением молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs, damage-associated molecular patterns). DAMPs действуют как естественные адьюванты для активации рецепторов PRR (PRRs, pattern recognition receptors) на поверхности иммунных клеток и запуска антиген-специфического иммунного ответа. При детальном изучении молекулярных механизмов некроптоза и пироптоза было обнаружено, что появление мембранных пор на поверхности клетки способно приводить к высвобождению многочисленных DAMPs и провоспалительных цитокинов, нарушению баланса электролитов клетки, ее набуханию и гибели. В процессе пироптоза формирование пор в плазматической мембране в значительной степени зависит от белков семейства гасдерминов (GSDMs, gasdermins), которые могут мультимеризоваться и встраиваться в мембрану, образуя крупные нанопоры [1]. В опухолевых клетках воздействие фактора некроза опухоли или действие химиотерапии/облучения способно активировать каспазу-3, которая в свою очередь

расщепляет GSDME и запускает пироптоз. Кроме того, цитотоксические Т-лимфоциты и естественные клетки-киллеры могут задействовать гранзимы для активации GSDMB и GSDME. Что касается механизма работы GSDMA в пироптозе опухолевых клеток, то детальный путь образования пор пока неясен. Однако, была показана способность GSDMA запускать пироптоз и проявлять противоопухолевую эффективность. Среди всех белков семейства гасдерминов GSDMD выступает в качестве эффекторного белка в пироптозе иммунных клеток, в то время как его функция и механизм работы в опухолевых клетках до сих пор не ясны. В случае некроптотической гибели ключевым порообразующим белком выступает киназа MLKL (mixed lineage kinase domain-like) [2]. Несмотря на то, что GSDMs и MLKL нацелены на одну и ту же клеточную мембрану, механизм, по которому они вызывают пермеабиллизацию плазматической мембраны, заметно отличается. При пироптозе GSDMs образуют большие и неселективные поры, которые опосредуют высвобождение белков, таких как интерлейкины и другие DAMP, еще до гибели клетки. В отличие от этого, при некроптозе MLKL индуцирует образование более мелких пор с ограниченной проницаемостью. Эти различия могут лежать в основе разной кинетики гибели и морфологических особенностей пироптотических и некроптотических клеток. Относительно недавно было показано, что белок *ninjurin-1* (NINJ1) также может участвовать в образовании больших мембранных пор в качестве «конечного» эффектора в процессе MLKL/GSDMs-зависимой ПГК [3]. Запуск иммуногенной клеточной гибели, опосредованный образованием пор, способствует не только высвобождению DAMPs и цитокинов, но и формированию иммуностимулирующего микроокружения опухоли [4]. В данном проекте в ходе предварительного анализа экспрессионных данных генов, регулирующих процессы порообразования, на основании открытых баз данных METABRIC (n=2509 пациентов) и GDC TCGA (n=956 пациентов) было обнаружено, что повышенная экспрессия GSDMB, GSDMC и MLKL в базальноподобном и HER2-позитивном подтипе РМЖ, коррелирует с высокой экспрессией иммунных регуляторных генов и инфильтрацией иммунных клеток, что позволяет определить эти подтипы как «иммунные горячие» опухоли. В то время как в люминальном подтипе а и б была более выражена экспрессия NINJ1 и наблюдалась низкая инфильтрация иммунных клеток. В связи с высокой актуальностью данного направления дальнейший анализ экспрессии генов, вовлеченных в эффекторную фазу иммуногенной клеточной гибели, в различных подтипах РМЖ, оценка взаимосвязи с микроокружением опухоли, и построение прогностических моделей на основании омических данных может оказать неоценимую помощь при определении прогноза и терапевтической тактики у пациентов с РМЖ.

Список литературы

1. Broz P., Pelegrín P., Shao F. The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation // *Nat Rev Immunol.* 2020. Vol. 20, N 3. P. 143–157. doi: 10.1038/s41577-019-0228-2
2. Garnish S.E., Meng Y., Koide A., et al. Conformational interconversion of MLKL and disengagement from RIPK3 precede cell death by necroptosis // *Nat Commun.* 2021. Vol. 12. ID 2211. doi: 10.1038/s41467-021-22400-z
3. Kayagaki N., Kornfeld O.S., Lee B.L., et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death // *Nature.* 2021. Vol. 591, N 7848. P. 131–136. doi: 10.1038/s41586-021-03218-7
4. Nagata S., Tanaka M. Programmed cell death and the immune system // *Nat Rev Immunol.* 2017. Vol. 17, N 5. P. 333–340. doi: 10.1038/nri.2016.153

Захаревич А.А.¹ ✉, Загоскин Ю.Д.¹, Власова А.Е.², Григорьев Т.Е.^{1,2}

Высокопористые микрочастицы на основе олеофильного N-фталойлхитозана

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Московский физико-технологический институт, Долгопрудный, Россия

✉ bestiamalum@yandex.ru

Аннотация. В работе представлен способ получения высокопористых микрочастиц на основе олеофильного N-фталойлхитозана. Показана способность частиц к избирательной сорбции масла, исследована их морфология. Подобные частицы могут быть использованы при создании систем доставки гидрофобных лекарственных препаратов.

Ключевые слова: фталойлхитозан; биополимеры; олеофильные полимеры; системы доставки лекарств.

Zakharevich A.A.¹, Zagoskin Yu.D.¹, Vlasova A.E.², Grigoriev T.E.^{1,2}

Highly porous microparticles based on oleophilic N-phthaloyl chitosan

¹ National Research Centre Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

Abstract. This work presents a method for producing highly porous microparticles based on oleophilic N-phthaloylchitosan. The ability of particles to selectively absorb oil was demonstrated, and their morphology was studied. Such particles can be used to create drug delivery systems for hydrophobic drugs.

Keywords: phthaloyl chitosan; biopolymers; oleophilic polymers; drug delivery systems.

Хитин является одним из самых распространенных в природе веществ, поскольку составляет основу экзоскелета многочисленных насекомых и ракообразных, а также входит в состав клеточной стенки некоторых грибов и водорослей. Хитозан чаще всего рассматривают как производное хитина, хотя граница между этими биополимерами весьма условна.

Повсеместное применение хитозана, в том числе в области медицинского материаловедения, обусловлено, во-первых, относительной доступностью биополимера, а во-вторых, рядом его полезных свойств. Основу этих свойств составляют присутствующие в цепи полимера первичные аминогруппы, способные к протонированию в кислой среде. Положительно заряженные протонированные аминогруппы хитозана проявляют повышенное сродство к отрицательно заряженным структурам живых организмов, чем обусловлены противовоспалительное, антимикробное, фунгицидное и ранозаживляющее действия полимера [1]. Кроме того, реакционноспособные функциональные группы позволяют химически модифицировать биополимер для придания ему новых ценных свойств.

Несмотря на многочисленные преимущества материалов на основе хитозана — биосовместимость, способность к биоразложению и низкую токсичность, — такие материалы имеют неудовлетворительные механические свойства во влажной среде из-за растворимости протонированного хитозана в воде. Это сильно ограничивает сферу применения материалов, изготовленных из этого полимера, и зачастую требует применения сшивающих агентов (многие из которых токсичны) для улучшения физико-механических характеристик материала [2].

Альтернативным подходом является использование водонерастворимых производных хитозана для получения материалов биомедицинского назначения. Одним из таких производных является фталойлхитозан, который получают в процессе одностадийной реакции ацилирования хитозана по аминогруппам фталевым

ангидридом [3]. Фталоилхитозан гидрофобен и растворяется лишь в некоторых органических растворителях, таких как диметилформамид и диметилсульфоксид. Это не только делает возможным формирование материалов различной морфологии из раствора полимера, но и предотвращает разрушение сложной структуры подобных материалов в водной среде.

В настоящей работе были получены высокопористые частицы на основе гидрофобного фталоилхитозана. N-фталоилхитозан растворяли в малотоксичном диметилсульфоксиде, который сам по себе является противовоспалительным препаратом и криопротектором, а затем распыляли в жидкий азот и высушивали лиофильно. Метод сублимации растворителя позволил создать сферические частицы с высокой удельной поверхностью, которые можно рассматривать как перспективный материал для сорбции различных, преимущественно гидрофобных, веществ.

Морфологию частиц, в том числе срезы, демонстрирующие их внутреннюю структуру, изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Было показано, что частицы имеют преимущественно сферическую форму, средний размер 50–150 мкм и пористую структуру как на поверхности, так и в объеме.

Также была исследована сорбционная активность частиц фталоилхитозана в отношении медицинского вазелинового масла в качестве модельного объекта. Показано, что такие частицы не только устойчивы к набуханию в воде, в отличие от частиц из немодифицированного хитозана, но также способны поглощать и удерживать до 5 г масла на один грамм сухих частиц. Это позволяет рассматривать подобные пористые частицы в качестве носителей для доставки гидрофобных лекарственных средств или препаратов, имеющих жировую основу.

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

Список литературы

1. Petroni S., Tagliaro I., Antonini C., et al. Chitosan-based biomaterials: Insights into chemistry, properties, devices, and their biomedical applications // *Mar Drugs*. 2023. Vol. 21, N 3. ID 147. doi: 10.3390/md21030147
2. Uddin M.S., Khand S., Dong C. Effect of crosslinking agents on chitosan hydrogel carriers for drug loading and release for targeted drug delivery // *Gels*. 2024. Vol. 10, N 7. ID 421. doi: 10.3390/gels10070421
3. Kurita K., Ikeda H., Shimojoh M., Yang J. N-phthaloylated chitosan as an essential precursor for controlled chemical modifications of chitosan: Synthesis and evaluation // *Polymer J*. 2007. Vol. 39, N 9. P. 945–952. doi: 10.1295/polymj.PJ2007032

Захарова И.С.¹ ✉, Шевченко А.И.¹, Слепцов А.А.², Назаренко М.С.², Тмоян Н.А.³, Зуева А.С.^{1,4}, Арссан МХД А.^{1,4}, Елисафенко Е.А.¹, Медведев С.П.¹, Шевченко В.А.¹, Зарубин А.А.², Ежов М.В.³, Кухарчук В.В.³, Парфёнова Е.В.³, Закиян С.М.¹

От клеточных моделей к пониманию молекулярных основ патогенеза семейной гиперхолестеринемии

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, Россия

³ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова, Москва, Россия

⁴ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ zakharova.is@gmail.com

Аннотация. С помощью редактирования оснований получена система изогенных линий ИПСК пациентов с СГХС. Эндотелий, полученный из ИПСК пациентов с СГХС, демонстрирует дисфункцию рецептора LDLR и дерегуляцию экспрессии генов.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; атеросклероз; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; CRISPR-Cas; редактирование оснований; дифференцированные эндотелиальные производные; гепатоорганойды; рецептор липопротеинов низкой плотности; дисфункция эндотелия.

Zakharova I.S.¹, Shevchenko A.I.¹, Sleptcov A.A.², Nazarenko M.S.², Tmoyan N.A.³, Zueva A.S.^{1,4}, Arssan Mhd A.^{1,4}, Elisaphenko E.A.¹, Medvedev S.P.¹, Shevchenko V.A.¹, Zarubin A.A.², Ezhov M.V.³, Kukharchuk V.V.³, Parfyonova Ye.V.³, Zakian S.M.¹

From cellular models to understanding the molecular basis of familial hypercholesterolemia

¹ Institute of cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Centre, RAS, Tomsk, Russia

³ National Medical Research Centre of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Abstract. An isogenic cell line system of FH patients' induced pluripotent stem cells (iPSCs) was generated using base editing. Endothelium derived from FH patients' iPSCs was observed to exhibit LDLR receptor dysfunction and deregulated gene expression.

Keywords: familial hypercholesterolemia; atherosclerosis; induced pluripotent stem cells; CRISPR-Cas; base editing; differentiated endothelial derivatives; hepatoorganoids; low-density lipoprotein receptor; endothelial dysfunction.

Семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — это наследственное заболевание, при котором патогенные аллельные варианты являются причиной повышенного уровня холестерина в плазме крови, что, в свою очередь, проявляется в развитии атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний. Несмотря на высокую частоту встречаемости и всемирную озабоченность общественного здравоохранения, эффективность помощи пациентам остается крайне низкой. Широкая распространенность, отсутствие общедоступного эффективного лечения и удобных релевантных моделей делают актуальной разработку клеточных моделей СГХС, отвечающих требованиям современной трансляционной медицины. Большинство случаев СГХС вызваны патогенными аллельными вариантами в гене рецептора липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) *LDLR*. Основная роль в патогенезе СГХС принадлежит рецепторам ЛПНП в клетках печени, ответственным

за интернализацию холестерина и его последующий метаболизм. Повышенный уровень холестерина ЛПНП в крови также влияет на кровеносные сосуды и сосудистые клетки посредством накопления липидов внутри интимы, вызывая окислительный стресс, рекрутирование воспалительных клеток и локальную продукцию цитокинов. Это приводит к эндотелиальной дисфункции и образованию атером в артериях, корне аорты и клапанах с последующим развитием более тяжелых патологий. Несмотря на то, что эндотелий участвует в патогенезе СГХС, мало известно о том, как сосудистые эндотелиальные клетки различаются у людей с нормальными и патогенными аллелями *LDLR*. Целью данной работы является получение изогенной системы линий ИПСК пациентов с СГХС, их релевантных дифференцированных производных и васкуляризированных гепатоорганоеидов на их основе. В результате работы получены и охарактеризованы 9 линий ИПСК от пациентов-компаундных гетерозигот по патогенным аллельным вариантам гена *LDLR* с тяжелыми клиническими проявлениями СГХС: с.530C>T/с.1054T>C; с.2141-966_2390-330del/с.1327T>C; с.1246C>T/с.940+3_940+6del/с.940+3_940+6del. С помощью нанопорового секвенирования показано, что патогенные аллельные варианты гена *LDLR* в геномах всех пациентов располагаются транс-положении. В данной работе впервые получены и исследованы эндотелиальные производные ИПСК пациентов с СГХС. Обнаружено, что эндотелиальные производные, полученные из ИПСК, экспрессируют белок LDLR, который в нормальных клетках выявляется преимущественно в зрелой форме. Эндотелиальные клетки, полученные из ИПСК пациентов с СГХС, демонстрируют пониженный уровень зрелого LDLR и сниженную способность к интернализации липопротеинов низкой плотности. Кроме того, эндотелиальные клетки с мутантным *LDLR* обнаруживают специфический профиль транскриптома с пониженной регуляцией генов транспорта монокарбоновых кислот, экзоцитоза и клеточной адгезии, а также с усиленной регуляцией сигнальных путей клеточной секреции и активации лейкоцитов. ИПСК пациентов с СГХС дифференцированы также в гепато- и мезенхимальные стромальные производные. На их основе с добавлением эндотелиальных производных получены васкуляризированные гепатоорганоеиды. В результате секвенирования РНК обнаружено, что в гепатоорганоеидах подавлялось большинство генов, связанных с биологическими процессами (регуляция активации клеток/лейкоцитов, позитивная регуляция сигнального пути Wnt, регуляция роста клеток, клеточный ответ на химический стресс). Среди транскриптов с повышенной экспрессией обнаружены гены, связанные с регуляцией сборки белково-липидного комплекса. С использованием CRISPR-Cas9-опосредованного редактирования оснований получены изогенные линии ИПСК пациента-компаундной гетерозиготы с.530C>T/с.1054T>C со скорректированными аллельными вариантами гена *LDLR*. Эндотелиальные производные генетически модифицированных ИПСК со скорректированным до «здорового» аллельным вариантом *LDLR* восстанавливают функциональность рецептора и имеют достоверно повышенный уровень интернализации меченой формы липопротеинов низкой плотности. Полученные ИПСК являются первой в России коллекцией ИПСК пациентов с разными формами патогенных мутаций гена *LDLR*, представляющей собой доступный практически в неограниченных количествах материал для направленной дифференцировки в релевантные клеточные типы и исследования молекулярно-генетических основ атеросклероза, вызванного СГХС. Полученные результаты указывают на то, что эндотелиальные клетки пациентов с СГХС сами по себе более предрасположены к окислительному стрессу и воспалению, что вместе с повышенным внешним уровнем холестерина может ускорять эндотелиальную дисфункцию, способствуя более быстрому прогрессированию атеросклероза и других сердечно-сосудистых патологий, связанных с СГХС. Генетическая коррекция патогенного аллельного варианта гена *LDLR* восстанавливает функциональность рецептора ЛПНП. Полученные клеточные модели СГХС внесут вклад в исследование заболевания и эффективную разработку таргетных терапевтических препаратов.

Исследование поддержано грантом РФ № 24-15-00346.

Захарченко А.Е.¹ ✉, Домнин П.А.¹, Медведев М.А.², Грошева А.Г.¹, Акишев Ю.С.², Ермолаева С.А.¹

Низкотемпературная аргоновая плазма стимулирует пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного акад. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² Троицкий институт инновационных и термоядерных исследований, Троицк, Россия

✉ zakharchenko_a_e@mail.ru

Аннотация. Показано, что низкотемпературная газовая плазма в дозозависимой манере стимулирует пролиферацию мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из костного мозга крыс Wistar.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; МСК; низкотемпературная аргоновая плазма.

Zakharchenko A.E.¹, Domnin P.A.¹, Medvedev M.A.², Grosheva A.G.¹, Akishev Yu.S.², Ermolaeva S.A.¹

Non-thermal argon plasma stimulates proliferation of mesenchymal stem cells

¹ Gamaleya National Research Centre on Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

² TRINITY, Troitsk, Russia

Abstract. Low-temperature gas plasma stimulates proliferation of mesenchymal stem cells (MSCs) obtained from the bone marrow of Wistar rats in a dose-dependent manner.

Keywords: mesenchymal stem cells; MSCs; non-thermal argon plasma.

Низкотемпературная плазма атмосферного давления (НТП) — это поток частично ионизированного газа, получаемый в результате воздействия на газ высокочастотного электромагнитного поля, имеющий комнатную температуру и содержащий, помимо ионов и электронов, активные формы кислорода и азота, формирующиеся в результате прохождения возбужденных молекул плазмообразующего газа через воздух. Ранее нами и другими группами было показано, что НТП обладает ранозаживляющим потенциалом [1, 2].

В данной работе мы исследовали как НТП влияет на мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Источник НТП, plasma jet, был описан ранее [3]. В качестве плазмообразующего газа использовали аргон (99,9%). Длина плазменного факела составляла около 1 см. В качестве источника МСК использовали костный мозг крыс Wistar (самцы, 250–300 г). МСК выращивали в среде α MEM (ПанЭко) в присутствии 10% FBS. В экспериментах использовали клетки из 3 пассажа с типичными характеристиками МСК. Использовали два подхода. В первом перед облучением выращенные в матрасе клетки суспендировали в 50 мл бессывороточной среды, непосредственно сразу после облучения суспензию разводили свежей средой в 10 и 100 раз и помещали разведения в стерильные матрасы. Подсчет колоний проводили через 10 дней. При втором подходе монослой МСК выращивали на стеклах, помещенных в 24-луночный планшет. Перед облучением стекла помещали в емкости, содержащие 50 мл бессывороточной среды. После облучения стекла переносили в свежую среду для роста. Число клеток и МТП-тест проводили через 24, 72 и 144 часа.

Облучение МСК в суспензии в течение 1 минуты приводило через 10 дней к увеличению числа клеток в 1,5 раза, в течение 3 минут — к 6-кратному уменьшению, в течение 5 минут — к полной гибели. Число колоний уменьшалось после 1 и 3 минут облучения в 2,4 и 43 раза, соответственно. Число клеток в колонии увеличивалось в 3,8 и 7,3 раза после 1 и 3 минут облучения, соответственно. Облучение неионизированным аргоном не влияло на количество живых клеток.

При облучении МСК, выращенных на стеклах, подсчет через 24 часа показал уменьшение числа клеток в 1,9 раза после 1 минуты, что коррелировало с уменьшением числа колоний, выросших после облучения суспензии. Уменьшение времени облучения до 30 секунд не приводило к сохранению числа клеток по сравнению с контролем, наблюдалось аналогичное уменьшение. Однако результаты МТТ теста не совпадали с прямым подсчетом клеток: через 24 часа метаболическая активность МСК в расчете на 1 клетку после 30-секундного облучения увеличивалась в 2,7 раза, а после облучения в течение 1 минуты — уменьшалась в 1,4 раза. Увеличение метаболической активности приводило к ускорению роста МСК, облученных 30 секунд, в 2 раза по сравнению с контролем в период с 24 до 72 часов. При этом прирост клеток, облученных 1 минуту, за это время не менялся по сравнению с контролем. Зато еще через 72 часа увеличивалась скорость роста МСК, облученных 1 минуту.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что облучение НТП стимулирует пролиферацию МСК в дозозависимой манере, причем динамика, а также, по-видимому, механизмы, ее определяющие, также имеют дозозависимый характер. Полученные результаты имеют значение для дальнейших исследований, направленных на стимуляцию роста МСК *in vitro* с помощью НТП.

Работа поддержана грантом РФФ № 24-45-20006.

Список литературы

1. Ermolaeva S., Varfolomeev A., Chernukha M., et al. Bactericidal effects of non-thermal argon plasma *in vitro*, in biofilms and in the animal model of infected wounds // J Med Microbiol. 2011. Vol. 60, N 1. P. 75–83. doi: 10.1099/jmm.0.020263-0
2. Heinlin J., Isbary G., Stolz W., et al. Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology // J Eur Acad Dermatol Venereol. 2011. Vol. 25, N 1. P. 1–11. doi: 10.1111/j.1468-3083.2010.03702.x
3. Sysolyatina E., Petryakov A., Abdulkadieva M., et al. Use of non-thermal plasma for decontamination of titanium implants // J Phys Conf Ser. 2022. Vol. 2270, N 1. ID 012045. doi:10.1088/1742-6596/2270/1/012045

Зиновьева А.А. ✉, Бахчинян Е., Каменков С.С., Чечехина Е.С., Кулебякин К.Ю.

Возраст-ассоциированные изменения кальциевой сигнализации в мультипотентных мезенхимных стволовых клетках

МНОИ, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ zinovevaanna356@gmail.com

Аннотация. При старении происходит переключение инсулина на неканонический инсулин-зависимый кальциевый сигналинг.

Ключевые слова: мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; инсулин; старение; кальциевая сигнализация.

Zinoveva A.A., Bakhchinyan E., Kamenkov S.S., Chechekhina E.S., Kulebyakin K.Yu.

Aging related changes in calcium signaling in multipotent mesenchymal stem cells

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. With aging, insulin switches to non-canonical insulin-dependent calcium signaling.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells; insulin; aging; calcium signaling.

Инсулин является не только гормоном, регулирующим энергетический баланс в организме, но также играет роль в процессах роста и дифференцировки тканей через канонический сигналинг при участии типичных для факторов роста клеточных сигнальных каскадов.

С возрастом инсулиновая сигнализация нарушается [1]. В нашей работе мы показали, что помимо нарушения проведения сигнала через классические сигнальные каскады инсулина происходит также переключение инсулина на неканонический инсулин-зависимый кальциевый сигналинг.

В качестве модели старения мезенхимных стволовых клеток (МСК) нами использовались репликативно старые клетки (клетки поздних пассажей) в сравнении с клетками, полученными от молодых доноров на ранних пассажах.

За 1–2 суток до начала эксперимента клетки в низкой плотности (20% от 100% конфлюентности) высаживали в 48-луночные планшеты. Непосредственно перед стимуляцией гормоном клетки в течение часа окрашивали с помощью специального флуоресцентного красителя Fluo-8 в концентрации 4×10^{-6} моль/л в растворе Хэнкса с Нерес в концентрации 2×10^{-2} моль/л. Данный краситель является хелатором кальция, проникает внутрь клетки и флуоресцирует при связывании с ионом Ca^{2+} . Для стимуляции клеток использовали раствор инсулина в концентрации 10^{-6} моль/л.

Изменение концентрации внутриклеточного кальция фиксировали по изменению интенсивности флуоресценции в каждой отдельной клетке при помощи микроскопа Nikon Eclipse Ti2 с камерой Kinetix, объективом Plan Fluor 10x. Стимуляция инсулином и механическая стимуляция происходила непосредственно во время съемки, так как кальциевый ответ клеток развивается достаточно быстро. Результаты оценивали как отношение разницы числа клеток, ответивших после стимуляции инсулином и после механической стимуляции к общему числу клеток в лунке.

Мы обнаружили, что в ответ на инсулин происходило повышение внутриклеточного уровня кальция. Одновременно при репликативном старении клеток происходит снижение проведения сигнала через канонический сигнальный каскад, что позволяет нам предположить, что в ходе старения происходит переключение

инсулинового сигнального каскада на неканонический кальциевый сигнальный каскад. Возможно, изменение физиологического действия инсулина при старении резидентных стволовых клеток может быть обусловлено включением альтернативных сигнальных каскадов.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ (Грант № 19-75-30007, Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека. <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

Список литературы

1. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O., et al. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo // *Front Cell Dev Biol.* 2022. Vol. 10. ID 1050489. doi: 10.3389/fcell.2022.10504

Зиновьева А.С.✉, Томилин А.Н., Бахмет Е.И.

Выявление ключевых аминокислот транскрипционного фактора Oct4, обеспечивающих гетеродимеризацию Sox2-Oct4 в плюрипотентных стволовых клетках мыши

ФГБНУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ a.zinoveva@incras.ru

Аннотация. Oct4 является ключевым фактором плюрипотентности. В эмбриональных стволовых клетках он выполняет свои функции в кооперации с Sox2. Мы предполагаем, что гетеродимеризация Sox2-Oct4 обеспечивается специфическими аминокислотами POU-домена Oct4: лейцином-16, лизином-19 и треонином-22.

Ключевые слова: Oct4; Sox2; плюрипотентные стволовые клетки.

Zinovyeva A.S., Tomilin A.N., Bakhmet E.I.

Identification of key amino acids of the Oct4 transcription factor that mediate Sox2-Oct4 heterodimerization in mouse pluripotent stem cells

Institute of Cytology, Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Oct4 is a key factor of pluripotency. In embryonic stem cells, it performs its functions in cooperation with Sox2. We propose that Sox2-Oct4 heterodimerization is enabled by specific amino acids of the Oct4 POU domain: leucine-16, lysine-19, and threonine-22.

Keywords: Oct4; Sox2; pluripotent stem cells.

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) отличаются способностью к самообновлению и к дифференцировке в любой тип соматических клеток, а также в половые клетки. Одним из ключевых маркеров ПСК является транскрипционный фактор Oct4. В ПСК Oct4 выполняет свои функции совместно с транскрипционным фактором Sox2, представителем SoxB-класса. Определенный уровень Oct4 необходим для поддержания плюрипотентности в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), а гетеродимеризация Sox2-Oct4 является обязательным условием эффективной индукции плюрипотентности в соматических клетках.

Oct4 относится к 5 классу семейства POU-доменных белков. Гетеродимеризация с белками SoxB-класса *in vivo* является отличительной характеристикой белков POU5-класса, тогда как представители остальных классов POU-доменных белков склонны образовывать гомодимеры на специфических ДНК-мотивах. По всей видимости, формирование гетеродимеров SoxB-POU5 *in vivo* обеспечивается структурными характеристиками 5 класса, которые отличают его от остальных классов POU-доменных белков.

При сравнении аминокислотных последовательностей POU-доменных белков мы отметили, что в зоне контакта POU-домена Oct4 и HMG-домена Sox2 сочетание фенилаланина-16 (F16), аргинина-19 (R19) и лизина-22 (K22) характерно для 1–4 и 6 классов, тогда как для белков 5 класса наблюдается тенденция к комбинации лейцина-16 (L16), лизина-19 (K19) и треонина-22 (T22). В связи с этим мы предположили, что замены L16F, K19R, T22K в POU-субдоме Oct4 могут повлиять на его предпочтение образовывать гетеродимеры с Sox2 и, как следствие, лишить его способности поддерживать и индуцировать плюрипотентность.

По результатам нашего исследования, мутированный Oct4 с одиночными заменами L16F, K19R, T22K и их комбинациями способен поддерживать ЭСК в недифференцированном состоянии после условного нокаута эндогенного Oct4. При этом мы не обнаружили значительных отличий в количестве «спасённых» ЭСК колоний

при использовании нативного Oct4 и мутированного Oct4. В составе репрограммирующей кассеты OSKM (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc) мутированный Oct4 способен индуцировать плюрипотентность в эмбриональных фибробластах мыши с различной эффективностью. Мы наблюдали тенденцию к увеличению эффективности репрограммирования при использовании Oct4-T22K, Oct4-L16F&T22K и её снижение при использовании Oct4-K19R, Oct4-K19R&T22K.

В фундаментальном аспекте, выявление ключевых аминокислот, обеспечивающих взаимодействие Sox2-Oct4 *in vivo*, позволит уточнить механизмы, которые необходимы для поддержания и индукции плюрипотентности. Кроме того, понимание этих принципов позволит эффективнее использовать ПСК в регенеративной медицине.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-75-10096, <https://rscf.ru/project/23-75-10096/>.

Зобкова Ю.О.¹ ✉, Петракова Н.В.¹, Комлев В.С.¹, Свиридова И.К.², Сергеева Н.С.², Чердынцева Т.А.³

Разработка биокерамики на основе церий-содержащих фосфатов кальция с антибактериальными свойствами

¹ Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ nyo.94@yandex.ru

Аннотация. В работе получена керамика на основе церий-содержащих гидроксиапатитов и трикальций-фосфатов. Изучен фазовый и химический состав, процессы растворимости материалов в модельном растворе СБФ, проведены биологические испытания *in vitro* на цитотоксичность и антибактериальную активность полученных материалов.

Ключевые слова: гидроксиапатит; трикальцийфосфат; церий; антибактериальная активность; биокерамика.

Zobkova Yu.O.¹, Petrakova N.V.¹, Komlev V.S.¹, Sviridova I.K.², Sergeeva N.S.², Cherdyntseva T.A.³

Development of bioceramics based on caesium-containing calcium phosphates with antibacterial properties

¹ A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences Moscow, Russia

² P.A. Herzen Moscow Research Oncology Institute, Branch of FSBI National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Ceramics based on cerium-containing hydroxyapatites and tricalcium phosphates were obtained in the work. The phase and chemical composition were studied, along with the solubility of the materials in a model SBF solution. *In vitro* tests were carried out to assess the cytotoxicity and antibacterial activity of the obtained materials.

Keywords: hydroxyapatite; tricalcium phosphate; cerium; antibacterial activity; bioceramics.

Функционализация биоматериалов на основе фосфатов кальция, в частности, гидроксиапатита (ГА) и трикальцийфосфата (ТКФ), посредством изоморфного замещения в их структуре ионов кальция на другие функциональные ионы является перспективным направлением в настоящее время. Таким образом возможно наделять материал биологически значимыми свойствами.

В настоящей работе в качестве катионов, обладающих функциональными свойствами, использовали ионы редкоземельного элемента (РЗЭ) церия (Ce). Ионы Ce обладают широким спектром положительных для медицины свойств: антибактериальной, противоопухолевой и антиоксидантной способностью. В физиологических условиях степень окисления ионов Ce может изменяться (Ce³⁺/Ce⁴⁺), в отличие от большинства других ионов РЗЭ. В этой связи ионы Ce проявляют антиоксидантные свойства при физиологических значениях pH среды и выступают в роли оксидазы при кислых значениях pH, что обеспечивает избирательное токсичное действие против раковых клеток. Отмечена высокая активность биоматериалов, содержащих Ce³⁺, против грамположительных и грамотрицательных бактерий, при этом цитотоксичность по отношению к остеобластоподобным клеткам отсутствует. Таким образом, применение биоматериалов на основе ГА и ТКФ, содержащих ионы Ce, обеспечит вместе с заполнением и заживлением костного дефекта — антибактериальное и противоопухолевое действие в зоне поражения непосредственно после хирургического вмешательства, что позволит снизить риски воспалений и отторжений и ускорить реабилитацию в послеоперационный период [1].

Настоящая работа направлена на разработку и исследование биокерамики на основе ГА и ТКФ, содержащих ионы Се в количествах до 0,5 масс. % (Се-ГА и Се-ТКФ). Введение ионов Ce^{3+} осуществляли на стадии получения порошков методом осаждения растворов [2, 3]. Для проведения биологических исследований была получена пористая керамика обжигом при температурах выше 1000°C в окислительной среде [2, 3]. Растворимость материалов оценивали путем выдерживания в растворе СБФ (SBF, simulated body fluid) до 56 сут с последующей оценкой количественного содержания элементов [Ca], [Ce] и [P] в растворе, а также исследованием микроструктуры поверхности керамики при помощи СЭМ. Биологические испытания *in vitro* по оценке острой цитотоксичности и цитосовместимости проводили на модели перевивной клеточной линии остеосаркомы человека MG-63. Антибактериальную активность исследовали диско-диффузионным методом против грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (*E. coli*) и *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) и грамположительных бактерий *Staphylococcus aureuse* (*S. aureuse*) и *Micrococcus luteus* (*M. luteus*).

Содержание церия в полученных материалах составило 0; 0,09; 0,23 и 0,46 масс. % для Се-ГА и 0; 0,07; 0,18 и 0,39 масс. % для Се-ТКФ. Установлено, что все керамические материалы Се-ГА соответствовали гексагональному ГА с содержанием примеси диоксида церия (CeO_2), что свидетельствовало об изменении степени окисления ионов $\text{Ce}^{3+} \rightarrow \text{Ce}^{4+}$ в процессе термообработки [2]. Керамика на основе Се-ТКФ представлена α -фазой с примесью β -фазы; в ряду концентраций допанта количество β -фазы увеличивалось, достигая 100 масс.% для материала с максимальной концентрацией ионов Се (0,39 масс. %) [3]. Установлено, что керамические материалы Се-ГА содержали преимущественно ионы Ce^{4+} (более 95%), в то время как в Се-ТКФ керамике содержались в основном ионы Ce^{3+} (до 75%).

В экспериментах по изучению растворимости полученной керамики в модельном растворе СБФ установлено, что высвобождение ионов Се из материала в раствор происходит в следовых количествах (доли ppm). При выдержке в СБФ-растворе на поверхности керамики образуется низкокristаллизованный кальцийфосфатный слой за счет ионнообменных процессов на границе раздела раствор-материал. В биологических испытаниях *in vitro* продемонстрировано отсутствие острой цитотоксичности, а также выраженные матричные свойства поверхности.

Установлено, что введение ионов Се обеспечивает антибактериальное действие материалов на основе ГА и ТКФ против грамположительных и грамотрицательных бактерий, в ряду концентраций допанта этот эффект растет. При этом керамика на основе Се-ТКФ проявляет более высокую антибактериальную активность по сравнению с Се-ГА ввиду более интенсивной растворимости, а также преимущественного содержания допанта в состоянии Ce^{3+} , характеризующегося более выраженными антибактериальными и противоопухолевыми свойствами.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-23-00640, <https://rscf.ru/project/23-23-00640/>.

Список литературы

1. Jakupec M.A., Unfried P., Keppler B.K. Pharmacological properties of cerium compounds. В кн.: Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology. Vol. 153. Berlin: Springer, 2005. P. 101–135. doi: 10.1007/s10254-004-0024-6
2. Petrakova N.V., Zobkova Yu.O., Komlev V.S. Synthesis and characterization of luminescent cerium-doped hydroxyapatite // Ceram Int. 2024. Vol. 50, N 12. P. 20905–20916. doi: 10.1016/j.ceramint.2024.03.093
3. Nikitina Yu.O., Petrakova N.V., Kozyukhin S.A. Thermal stability and luminescence properties of cerium containing tricalcium phosphate // Inorg Mater. 2023. Vol. 59, N 4. P. 394–403. doi: 10.1134/S002016852304009X

Зорохович Д.А.^{1,2} ✉, Комарова С.О.³, Морозова Е.Б.³, Воронцов П.А.³, Шмигельский Е.А.³,
Пшеничников С.Е.³, Антипова В.Н.³

Биосовместимые нанокompозитные материалы для тканевой инженерии

¹ НИУ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ НОЦ «Умные материалы и биомедицинские приложения» БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

✉ dar.zoro@yandex.ru

Аннотация. Электроактивные материалы находят применение в тканевой инженерии благодаря своей способности влиять на процессы регенерации. Для клинического применения требуется подтвердить их биосовместимость.

Ключевые слова: биосовместимость; электроактивные материалы; тканевая инженерия; поливинилиденфторид; наночастицы; регенерация.

Zorokhovich D.A.^{1,2}, Komarova S.O.³, Morozova E.B.³, Vorontsov P.A.³, Pshenichnikov S.E.³,
Shmigelsky E.A.³, Antipova V.N.³

Biocompatible nanocomposite materials for tissue engineering

¹ NRU Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

³ KIBFU Research and Education Center "Smart Materials & Biomedical Applications", Kaliningrad, Russia

Abstract. Electroactive materials are used in tissue engineering due to their ability to influence regeneration processes. For clinical use, it is required to confirm their biocompatibility.

Keywords: biocompatibility; electroactive materials; tissue engineering; polyvinylidene fluoride; nanoparticles; regeneration.

Электроактивные материалы находят применение в тканевой инженерии благодаря своей способности влиять на процессы регенерации. Они могут преобразовывать механическое напряжение в электрический потенциал. Генерируемые электрические импульсы стимулируют клетки, улучшая их адгезию, пролиферацию и дифференциацию, что способствует восстановлению ткани. Включение ферромагнитного наполнителя позволяет активировать электроактивные свойства субстрата с помощью переменного магнитного поля. К таким функциональным материалам относятся композиты на основе пьезоэлектрических полимеров [1]. Для использования в клинической практике следует подтвердить их биосовместимость, чтобы гарантировать безопасное и эффективное взаимодействие с организмом пациента.

Данное исследование включало создание магнитоэлектрических нанокompозитов на основе поливинилиденфторида (ПВДФ) и анализ их влияния на жизнеспособность и пролиферацию клеточной культуры Neuro 2A. Подложки были изготовлены методом Doctor Blade [2] с двумя видами поверхности: гладкие — путем заливки на стекло, и микротекстурированные — на специальный текстурированный столик. При этом образцы делали как без добавления наполнителя, так и с 5 и 10% наночастиц CoFe_2O_4 от массы полимера. Полученные пленки стерилизовали (70% этиловым спиртом и УФ-излучением в течение не менее 2 ч) и закрепляли на дне культурального планшета. На них высевали клеточную линию Neuro 2A и культивировали 96 ч в стандартных условиях (37 °C и 5% CO_2). Клетки дополнительно стимулировали переменным магнитным полем каждый день в течение 30 мин. Их жизнеспособность и активность пролиферации оценивали

с помощью WST-1-анализа. Измерение оптической плотности среды выполнялось на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Установлено, что жизнеспособность клеток на поверхности композитов превышает 90% в сравнении с контролем. Ускорение пролиферации клеток наблюдается на микротекстурированных образцах, стимулированных переменным магнитным полем. Соответственно, разработанные материалы обладают потенциалом для применения в качестве основы для роста клеток и инструмента для их электростимуляции.

Список литературы

1. Antipova V., Omelyanchik A., Sobolev K., et al. Enhancing wettability and adhesive properties of PVDF-based substrates through non-thermal helium plasma surface modification // *Polymer*. 2024. Vol. 290. ID 126567. doi: 10.1016/j.polymer.2023.126567
2. Ribeiro C., Costa C.M., Correia D.M., et al. Electroactive poly(vinylidene fluoride)-based structures for advanced applications // *Nat Protoc*. 2018. Vol. 13. P. 681–704. doi: 10.1038/nprot.2017.157

Зубкова Е.С.¹ ✉, Калинин А.П.^{1,2}, Меньшиков М.Ю.¹, Парфенова Е.В.^{1,2}

Кокультивирование мезенхимальных стромальных клеток и лимфоцитов в 3D-условиях, как модель третичных лимфоидных структур

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия

² МГУ им. Ломоносова, Москва, Россия

✉ cat.zubkova@gmail.com

Аннотация. Взаимодействие мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с разными типами иммунных клеток играет важную роль в регуляции воспаления и восстановления тканей. Мы использовали 3D-культуры лимфоцитов и МСК жировой ткани для изучения фенотипических изменений МСК *in vitro* и *in vivo* за 15 дней.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; иммуномодуляция; третичные лимфоидные структуры.

Zubkova E.S.¹, Kalinin A.P.^{1,2}, Menshikov M.Yu.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,2}

3D co-culture of mesenchymal stromal cells and lymphocytes as a model for tertiary lymphoid structures

¹ National Medical Research Centre of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The interaction of mesenchymal stromal cells (MSCs) with different types of immune cells plays a crucial role in the regulation of inflammation and tissue repair. We used 3D co-cultures of lymphocytes and adipose tissue MSCs to study the phenotypic changes of MSCs both *in vitro* and *in vivo* over 15 days.

Keywords: mesenchymal stromal cells; immunomodulation; tertiary lymphoid structures.

Персонализированная иммунотерапия является одним из самых перспективных подходов для лечения опухолей и иммунных заболеваний. Одним из многообещающих направлений в этой области может стать создание искусственных третичных лимфоидных структур (ТЛС). ТЛС представляют собой структурированный некапсулированный агрегат лимфоцитов, миелоидных и стромальных клеток [1]. Эти структуры формируются в неиммунных тканях в ответ на хроническое воспаление и служат хабами для пролиферации и активации иммунных клеток. Относительно недавно была обнаружена способность мезенхимальных стромальных клеток (МСК) к формированию ТЛС [2]. МСК обеспечивают поддержание постоянного состава тканей в норме и его восстановление после повреждения по-видимому, в том числе и за счет образования специфического микроокружения или «ниши» для пролиферации лимфоцитов. Для исследования возможности использования МСК жировой ткани для создания искусственных ТЛО мы разработали метод получения аутологичных МСК и лимфоцитов из жировой ткани человека и мыши и создали 3D-модель их совместного культивирования *in vitro*. Фенотипический анализ срезов органоидов методом иммунофлуоресценции показал, что МСК в значительной степени экспрессируют подопланин — маркер стромальных фибробластных ретикулярных клеток лимфоузлов. Однако, несмотря на это, МСК в 3D-органоидах не формируют зрелую ретикулярную структуру. Иммуноцитохимическое окрашивание органоидов на маркеры фолликулярных дендритных клеток — CD21 и CD35 — выявило небольшие участки локализации таких

клеток внутри органоида. Вероятно, небольшое количество этих клеток связано с тем, что в органоидах практически отсутствуют В-лимфоциты (окрашивание на CD3 и CD20). Методом ПЦР также было показано изменение экспрессии ряда маркеров МСК при сокультивировании с лимфоцитами в 3D-условиях относительно 2D кокультуры. Таким образом, полученные нами органоиды преимущественно содержат клетки, подобные ретикулярным стромальным клеткам лимфоузлов. В целом, полученные результаты раскрывают механизмы, лежащие в основе образования ТЛС. Для оценки возможности полученных смешанных органоидов поддерживать пролиферацию лимфоцитов *in vivo* нами была разработана методика трансплантации органоидов в подкожную жировую ткань мышей линии C57Bl с использованием аутологичного фибринового клея. Экспериментальных животных разделили на 3 группы по 5 животных (пустой фибриновый гель, органоиды только из МСК и смешанные органоиды). Через 15 дней подкожный жир извлекали и проводили иммуногистохимическое исследование образцов. Мы обнаружили, что и органоиды из МСК и комбинированные органоиды показали хорошую приживаемость и васкуляризацию. Внутри органоидов были обнаружены очаги экспрессии CD21 (фолликулярные дендритные клетки и В-лимфоциты), а также присутствие Т-лимфоцитов (CD3). Таким образом, полученные нами результаты позволяют предположить возможность функционирования трансплантированных органоидов, как ТЛО и в дальнейшем использовать эту модель для оценки роли ТЛО в регенерации при повреждении и хроническом воспалении.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00546.

Список литературы

1. Yin C., Mohanta S.K., Sriakulapu P., et al. Artery tertiary lymphoid organs: powerhouses of atherosclerosis immunity // *Front Immunol.* 2016. Vol. 7. ID 387. doi: 10.3389/fimmu.2016.00387
2. Dorraji S.E., Hovd A.-M.K., Kanapathipillai P. Mesenchymal stem cells and T cells in the formation of Tertiary Lymphoid Structures in Lupus Nephritis // *Sci Rep.* 2018. Vol. 8. ID 7861. doi: 10.1038/s41598-018-26265-z

Зуева А.С.^{1,2} ✉, Шевченко А.И.¹, Медведев С.П.¹, Закиян С.М.^{1,2}, Захарова И.С.¹

CRISPR/Cas9-опосредованная коррекция гена *LDLR* на модели ИПСК пациентов с семейной гиперхолестеринемией

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ a.zueva@g.nsu.ru

Аннотация. С помощью CRISPR/Cas9-опосредованного редактирования оснований получена система генетически модифицированных изогенных линий ИПСК пациента с семейной гиперхолестеринемией, которая может быть использована для изучения молекулярного патогенеза заболевания и подбора потенциальных лекарственных средств.

Ключевые слова: семейная гиперхолестеринемия; ИПСК; атеросклероз; клеточные модели; редактирование оснований; изогенные линии.

Zueva A.S.^{1,2}, Shevchenko A.I.¹, Medvedev S.P.¹, Zakian S.M.^{1,2}, Zakharova I.S.¹

CRISPR/Cas9-mediated correction of the *LDLR* gene in a model of ipscs from patients with familial hypercholesterolemia

¹ Institute of cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Abstract. A system of genetically modified isogenic iPSC lines from a patient with familial hypercholesterolemia was obtained through the use of CRISPR/Cas9-mediated base editing. This system can be employed for the study of the molecular pathogenesis of the disease and the selection of potential drugs.

Keywords: familial hypercholesterolemia; iPSCs; atherosclerosis; cell models; base editing; isogenic cell lines.

Одно из самых распространенных наследственных заболеваний в мире — семейная гиперхолестеринемия (СГХС) — характеризуется повышенным риском развития атеросклеротических поражений сосудов, приводящих к заболеваниям сердечно-сосудистой системы. Возникновение атеросклеротических бляшек вследствие СГХС в большинстве подтвержденных случаев обусловлено нарушениями в работе гена рецептора липопротеинов низкой плотности (*LDLR*), отвечающего за выведение холестерина из кровяного русла. На сегодняшний день не существует эффективных подходов к диагностике и лечению СГХС. Для решения этой проблемы необходимо создание моделей, отражающих молекулярный патогенез заболевания на основе пациент-специфичных ИПСК для подбора новых потенциальных фармпрепаратов. В нашей работе впервые получена система изогенных генетически модифицированных ИПСК со скорректированными аллельными вариантами гена *LDLR* на основе линии ICGi036-A (RRID:CVCL_B5EJ) от пациента-компаундной гетерозиготы с двумя аллельными вариантами гена *LDLR*: с.530C>T (p.Ser177Leu), rs121908026, ClinVar ID 3686, OMIM:606945.0004 (патогенный) и с.1054T>C (p.Cys352Arg), rs879254769, ClinVar ID 251618 (вероятно патогенный). В качестве подхода для коррекции однонуклеотидных замен использован метод CRISPR/Cas-опосредованного редактирования оснований (base editing), который не вносит двухцепочечных разрывов в ДНК, что позволяет свести нецелевые эффекты к минимуму по сравнению с классическим методом. В результате редактирования получены три генетически модифицированные линии ИПСК: гомозигота по «здоровой» позиции с.530C и гомозигота по «больной» позиции с.530T. Линии демонстрируют сохранение свойств плюрипотентности, несмотря на генетическую модификацию. Впервые для пациентов с СГХС получены эндотелиальные производные генетически модифицированных изогенных линий ИПСК.

Эндотелиоциты — важные участники атерогенеза: в субэндотелиальном пространстве накапливаются липопротеины, вызывая атерогенез. Ранее в нашей работе было впервые показано, что эндотелиальные производные ИПСК пациентов с СГХС демонстрируют дисфункцию по захвату липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [1]. Эндотелиальные производные линии ИПСК, гомозиготной по «здоровой» позиции с.530С, демонстрируют достоверное восстановление функциональной способности интернализировать ЛПНП. В линии, гомозиготной по «больной» позиции с.530Т, показано отсутствие интернализации ЛПНП — полная потеря функциональных свойств белка LDLR. Полученная система изогенных линий ИПСК пациентов с СГХС и их эндотелиальных производных может стать платформой для изучения течения патологических процессов на молекулярном уровне, а также оценки эффективности потенциальных фармакологических препаратов.

Исследование поддержано грантом РНФ № 24-15-00346.

Список литературы

1. Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Arssan Mhd A., et al. iPSC-derived endothelial cells reveal LDLR dysfunction and dysregulated gene expression profiles in familial hypercholesterolemia // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 2. ID 689. doi: 10.3390/ijms25020689

Иванова В.П.

Полимеры в регенеративной медицине

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ valet@iephb.ru

Аннотация. В работе суммированы данные по созданию биоматериалов, используемых в области тканевой регенерации. Обсуждается взаимозависимость между свойствами синтетических биополимеров и клеточным ответом в биоинженерных конструкциях.

Ключевые слова: тканевая инженерия и регенерация; синтетические биополимеры; клетки.

Ivanova V.P.

Polymers in regenerative medicine

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The thesis summarizes the biomaterial design in the field of tissue regeneration. Relationships between synthetic biopolymer characteristics and cell response in tissue engineering constructs are discussed.

Keywords: tissue engineering and regeneration; synthetic biopolymers; cells.

Создание новых биоматериалов для оптимальной интеграции последних в специализированные ткани остается одной из основных задач в области тканевой инженерии и регенеративной медицины. Для успешного применения в регенеративной медицине биополимерных конструкций необходимо проводить многопрофильный анализ процессов интеграции полимеров с тканями в ходе их иммобилизации с последующим контролем модификации активности биополимерных структур в организме.

В настоящее время выбор биополимеров достаточно широк. Для структурирования биоконструкций используются такие синтетические полимеры, как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, поли(ϵ -капролактон), поливиниловый спирт, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и некоторые другие.

Исходные инженерные конструкции (из полимеров/неорганических соединений) покрывают полимерами, химические свойства которых определяют функциональность биоплатформ. В идеале биополимерные покрытия должны соответствовать свойствам воссоздаваемой ткани. Особенно это важно для формирования в ходе трансплантации или регенерации клеточной популяции с заданным спектром клеточной активности, включая адгезию, распластывание, миграцию клеток, а также способность формировать межклеточные контакты и дифференцироваться.

Свойства полимерных покрытий можно изменять введением функциональных групп с различными химическими и физическими характеристиками. Изменение параметров биополимерных поверхностей — важный аспект изучения взаимодействия клеток с биополимерами. Существует два подхода для модификации полимерной поверхности биоконструкций: изменение топографических характеристик и химических свойств. В первом случае обработка полимерных поверхностей физическими методами приводит к образованию нерегулярных поверхностей с повторяющимися элементами различной формы и геометрии (борозды, зигзагообразные углубления, стержневидные выпуклости, фибриллы, поры различного диаметра). Подобные модификации биополимерной поверхности обеспечивают варьирование условий для адгезии клеточной популяции, увеличивая площадь взаимодействия клеток с биоконструкциями. Изменение топографических характеристик полимерных покрытий оказывает также воздействие на клеточную морфологию и экспрессию белков ВКМ клетками. Специфичность взаимодействия клеток с биополимерной поверхностью достигается введением в структуру полимера функциональных групп с помощью ковалентного связывания коротких

пептидов, относящихся к группе адгезивных молекул (RGD, PHSRN, DGEA, RRETAVA и др.). Последние специфически связываются с интегриновыми рецепторами клеток, обеспечивая проведение адгезивного сигнала и формирование фокальных адгезий, обязательного этапа для прикрепления, пролиферации и дифференцировки клеток в регенерирующих тканях. Изменяя концентрацию и пространственное распределение пептидных групп на полимерной поверхности можно регулировать клеточный ответ, усиливая или ослабляя его. Для обеспечения большей подвижности адгезионных молекул связывание последних с биополимерами осуществляется через спейсерные фрагменты. В этом случае в полной мере сохраняется биологическая активность функциональных групп.

В перспективе, правильно подобранные полимерные покрытия на различных по строению платформах могут использоваться в качестве поверхностей, имитирующих ткани человека.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИЭФБ РАН № 075-00264-24-00.

Иванова Е.И.^{1,2} ✉, Файзуллин А.Л.^{1,3}, Гринин В.О.⁴, Тимашев П.С.^{1,3}

Применение искусственного интеллекта для диагностики отторжения почечных трансплантатов: перспективы в регенеративной медицине

¹ Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

³ НЦМУ «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁴ ПАО «ВымпелКом», Москва, Россия

✉ ivanova_e_i_1@staff.sechenov.ru

Аннотация. В исследовании представлена модель глубокого обучения на основе Mask R-CNN для точной диагностики острых форм отторжения почечных трансплантатов. Наш алгоритм автоматизирует оценку фиброза и инфильтрации, что имеет важное значение для регенеративной медицины и улучшения персонализированного лечения.

Ключевые слова: искусственный интеллект; отторжение трансплантата; цифровая патология; вычислительная патология.

Ivanova E.I.^{1,2}, Fayzullin A.L.^{1,3}, Grinin V.O.⁴, Timashev P.S.^{1,3}

The use of artificial intelligence in the diagnosis of kidney transplant rejection: opportunities in regenerative medicine

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

² B.V. Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russia

³ World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁴ PJSC VimpelCom, Moscow, Russia

Abstract. The study presents a deep learning model based on Mask R-CNN for accurate diagnosis of acute kidney transplant rejection. The algorithm automates the assessment of fibrosis and infiltration, which is crucial for regenerative medicine and improving personalized treatment.

Keywords: artificial intelligence; transplant rejection; digital pathology; whole slide images; computational pathology.

Регенеративная медицина, как быстро развивающаяся отрасль биомедицины, направлена на восстановление функций тканей и органов через процессы инженерии тканей и их трансплантации. Одним из ключевых вызовов в этой области остается вопрос долговечности и функциональности трансплантатов, особенно в условиях высокой вероятности их отторжения. Отторжение трансплантата, являющееся иммунной реакцией организма на чужеродные антигены, остается основной причиной неудач после трансплантации почек. Традиционные методы диагностики, основанные на визуальном анализе биопсий и использовании Vanff-классификации, страдают от субъективности и межклинической вариативности. В этой связи, применение искусственного интеллекта (ИИ) открывает новые возможности для стандартизации и улучшения диагностики, что имеет особое значение для регенеративной медицины.

Основной целью нашего исследования была разработка ИИ-модели для диагностики острых форм отторжения почечных трансплантатов. Особое внимание мы уделили вопросу точного разграничения явного отторжения от пограничных изменений, что может существенно повысить качество и воспроизводимость диагностики в клинической практике. Нами была разработана модель глубокого обучения на основе архитектуры Mask R-CNN, которая является одной из самых эффективных в задачах сегментации и классификации изображений. Для обучения модели мы использовали 120 сканов гистологических препаратов биоптатов почечных трансплантатов от пациентов с клеточным отторжением трансплантата в анамнезе. Для повышения точности и воспроизводимости результатов модель прошла этапы предварительного обучения и настройки параметров на основе перекрестной валидации. Одним из ключевых аспектов разработки является автоматизация оценки фиброза (сi) и интерстициальной инфильтрации (i) в трансплантате почки, которые являются важными прогностическими показателями при диагностике отторжения трансплантатов. Для этого были использованы методы автоматической сегментации структур почечной ткани (клубочков, канальцев, артерий и стромы) и создания дополнительных классов — стромы и зоны инфильтрации иммунными клетками. Модель показала высокую точность сегментации почечных структур, достигнув среднего значения точности (mAP) 0,74. Была выявлена сильная положительная нелинейная корреляция между размерами участков инфильтрации и фиброзом, что подчеркивает потенциал модели в оценке этих параметров при изучении биоптатов трансплантированной почки. ROC-анализ продемонстрировал высокую прогностическую точность в различении показателей сi и i, основанных на измерении площади инфильтрации и фиброза. В частности, мы обнаружили, что увеличение площади инфильтрации коррелирует с более обширной областью фиброза в трансплантате, а также с высокими оценками показателей сi и i по шкале Banff, что подтверждает способность модели точно дифференцировать различные стадии отторжения.

Полученные результаты демонстрируют значительные перспективы использования разработанной ИИ-модели в регенеративной медицине. В первую очередь, это касается улучшения мониторинга состояния трансплантатов и оценки их функциональности в долгосрочной перспективе. Точная и воспроизводимая диагностика, обеспечиваемая ИИ, может существенно снизить риск неоправданного вмешательства или, наоборот, промедления в принятии критических терапевтических решений. Еще одним важным аспектом является возможность использования ИИ для предсказания не только отторжения, но и восстановления тканей, что может служить основой для разработки новых методов регенеративной терапии. В будущем исследования в этой области должны быть направлены на расширение функциональности ИИ-моделей, включение новых прогностических параметров и их интеграцию в клиническую практику.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 22-15-00467.

Иванова Ю.С.✉, Гурьев Н.А., Пуговкина Н.А., Люблинская О.Г.

Изменение антиоксидантной активности при старении и ревитализации мезенхимных стволовых клеток человека

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ ju.s.ivanova@yandex.ru

Аннотация. В данной работе с использованием генетически кодируемого биосенсора перекиси водорода HyPer проведена количественная прижизненная оценка функциональной активности систем антиоксидантной защиты в репликативно состаренных и ревитализованных мезенхимных стволовых клетках человека.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; репликативное старение; ревитализация; биосенсор перекиси водорода HyPer; антиоксидантная активность; активные формы кислорода.

Ivanova J.S., Guriev N.A., Pugovkina N.A., Lyublinskaya O.G.

Changes in antioxidant activity during senescence and rejuvenation of human mesenchymal stem cells

Laboratory of Intracellular Signaling, Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. In the present study, we performed a quantitative lifetime assessment of the functional activity of antioxidant defense systems during senescence and revitalization of human mesenchymal stem cells using the genetically encoded hydrogen peroxide biosensor HyPer.

Keywords: mesenchymal stem cells; replicative senescence; revitalization; hydrogen peroxide biosensor HyPer; antioxidant activity; reactive oxygen species.

Мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) имеют широкий спектр биомедицинских приложений, включая клеточную терапию и скрининг лекарственных препаратов. Однако, долговременное культивирование МСК, часто необходимое для подготовки достаточного количества клеточного материала для терапевтических целей, сопровождается развитием состояния, называемого репликативным старением. Известно, что репликативное старение сопровождается перестройкой окислительно-восстановительного (редокс) гомеостаза, однако детальная оценка различных внутриклеточных редокс-параметров осложняется недостатком подходящих методик анализа.

В нашем исследовании мы применили генетически кодируемый биосенсор перекиси водорода HyPer [1] для оценки функциональной активности системы антиоксидантной защиты в процессе клеточного старения. Используя недавно разработанные нами прижизненные методы на основе проточной цитометрии [2, 3], мы смогли оценить пероксидазную и дисульфид-редуктазную активность МСК в условиях внешнего окислительного стресса на основе измерений кинетики окисления и восстановления HyPer, соответственно. Мы показали, что тиоредоксин-зависимая дисульфид-редуктазная активность постепенно снижается при развитии репликативного старения, достигаемого путем длительного культивирования МСК (в течение 35–40 пассажей). В то же время пероксидазная активность в клетках поздних пассажей наоборот возрастает, что идет в разрез с существующим представлением об ослабленной антиоксидантной защите в сенесцентных клетках.

Еще одной из широко признанных редокс-характеристик состаренных клеток является повышенный уровень активных форм кислорода (АФК), преимущественно определяемый с использованием красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (H₂DCFDA). Результаты наших исследований вносят некоторые

уточнения в эту концепцию, свидетельствуя о том, что уровень АФК, определяемый путем измерения сигнала окисленного красителя H_2DCFDA , зависит от размера клетки. При проведении нормализации этого уровня на внутриклеточное содержание белка получаемые величины оказываются схожими для молодых и репликативно состаренных МСК.

В 2016 году, в качестве возможного способа обращения клеточного и организменного старения, А. Осампро и соавт. был разработан новый метод — метод частичного репрограммирования [4]. В рамках данной методики, используя векторы на основе вируса Сендай, которые содержали гены, кодирующие факторы транскрипции Яманака Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc, мы предприняли попытку омолодить МСК человека, состаренные в результате длительного культивирования. Через 5 дней после трансдукции мы наблюдали утрату ключевых маркеров, ассоциированных со старением. Параллельно с этим, мы выявили всплеск активности дисульфид-редуктазы, которая оказалась даже выше, чем у МСК раннего пассажа. Таким образом, полученные данные могут способствовать более глубокому пониманию редокс-метаболизма, связанного со старением клеток человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 23-74-01142).

Список литературы

1. Belousov V. V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat Methods*. 2006. Vol. 3. P. 281–286. doi: 10.1038/nmeth866
2. Zenin V., Ivanova J., Pugovkina N., et al. Resistance to H_2O_2 -induced oxidative stress in human cells of different phenotypes // *Redox Biol*. 2022. Vol. 50. ID 102245. doi: 10.1016/j.redox.2022.102245
3. Zhuravlev A., Ezeriņa D., Ivanova J., et al. HyPer as a tool to determine the reductive activity in cellular compartments // *Redox Biol*. 2024. Vol. 70. ID 103058. doi: 10.1016/J.REDOX.2024.103058
4. Ocampo A., Reddy P., Martinez-Redondo P., et al. *In vivo* amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming // *Cell*. 2016. Vol. 167, N 7. P. 1719–1733.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.05

Ивановская Е.В.^{1,2} ✉, Войтенко Д.А.^{1,3}, Мишуков А.А.¹, Свешникова А.Н.^{1,3,4}

Влияние гиалуроновой кислоты и поперечно-сшитых продуктов на фибробласты кожи человека

¹ Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии, РАН, Москва, Россия

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

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачёва, Москва, Россия

✉ kivanovskaia27@gmail.com

Аннотация. В настоящее время в эстетической медицине для замедления признаков старения широко используются препараты на основе гиалуроновой кислоты (ГК). В работе продемонстрировано, как чистая ГК и гель на её основе, сшитый дивинилсульфоном, в различных концентрациях влияют на фибробласты и фиброциты кожи человека.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота; филлеры; дивинилсульфон; фибробласты.

Ivanovskaya E.V.^{1,2}, Voytenko D.A.^{1,3}, Mishukov A.A.¹, Sveshnikova A.N.^{1,3,4}

Effect of hyaluronic acid and cross-linked products on human dermal fibroblasts

¹ Center for Theoretical Problems of Physico Chemical Pharmacology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Mendeleev University of Chemical-Technology of Russia, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Abstract. Currently, hyaluronic acid (HA)-based preparations are widely used in aesthetic medicine to slow down the signs of aging. The work demonstrates how pure HA and a gel based on it, cross-linked with divinyl sulfone, in various concentrations affect fibroblasts and fibrocytes of human skin.

Keywords: hyaluronic acid; fillers; divinyl sulfone; fibroblasts.

В современном мире одним из наиболее широко используемых полимеров в эстетической медицине является гиалуроновая кислота (гиалуронан). Структура полимера представляет собой линейный, отрицательно заряженный и несulfатированный гликозаминогликан, который включает N-ацетил-D-глюкозамин и D-глюкуроновую кислоту, многократно связанные гликозидными связями в порядке чередования β -(1→4) и β -(1→3).

ГК является биоразлагаемым полимерным материалом с широким диапазоном молекулярной массы и уникальной способностью удерживать большое количество воды. В организме человека этот полимер встречается практически во всех тканях: во внеклеточном матриксе клеток (с наибольшим распределением вокруг клеток кожи), в соединительной ткани, суставной ткани, а также стекловидном теле. Как полисахарид внеклеточного матрикса, он выполняет множество структурных, реологических, физиологических и биологических функций в организме, участвует в таких процессах, как ранозаживления, пролиферации и миграции клеток, а также является сигнальной молекулой [1].

В эстетической медицине и косметологии гиалуроновую кислоту используют в основном виде раствора или поперечно-сшитого гидрогеля. Растворы ГК используются в основном для увлажнения кожи, а сама гиалуроновая кислоты биodeградирует меньше, чем за неделю. Для более долгого удерживания

гиалуроновой кислоты во внеклеточном матриксе используют поперечно-сшитые гели, которые получают путем добавления сшивающих агентов, таких как бутандиолдиглицидиловый эфир (БДДЕ) и дивинилсульфон (ДВС) [2]. Такие гели в эстетической медицине используют для создания эффектов лифтинга и филлинга, что в комплексе дает омолаживающий эффект.

Известно, что в организме происходит постоянный синтез и распад молекул гиалуроновой кислоты. Синтез происходит преимущественно фибробластами на поверхности клеточной мембраны гиалуронан-синтазами HAS 1, HAS 2, HAS 3. В то время, как биodeградация происходит за счет гиалуронидаз HYAL 1 и HYAL 2. Последняя инициирует деградацию цепи ГК на фрагменты до 20 кДа (примерно 50–60 дисахаридных единиц) во внеклеточном матриксе. Данный фермент присутствует и на клеточной мембране, взаимодействуя с рецептором CD44, HYAL2 инициирует захват молекул ГК, формируя эндосомы, которые затем транспортируются в лизосомы. В лизосомах содержится фермент HYAL1 и уже под его действием молекулы ГК разлагаются до тетрасахаридов массой 800 Да, которые являются преобладающим конечным продуктом деградации [3]. После введения поперечно-сшитого продукта предположительно происходит тот же механизм деградации и захвата ГК клеткой.

Для подтверждения захвата молекул ГК из поперечно-сшитого продукта в работе было проведено исследование на фибробластах (7 пассаж) и фиброцитах (17 пассаж). Клетки выращивались на покровных стеклах при стандартных условиях. После достижения конfluenceности 50% среда заменялась на среду с добавленным продуктом на основе ГК, сшитой ДВС, в различных концентрациях. Через 30 минут инкубации клетки фиксировали и окрашивали ядро, миозин и гиалуроновую кислоту. Снимки были получены методом конфокальной микроскопии. Молекулы ГК из поперечно-сшитого геля действительно проникают внутрь фибробластов и фиброцитов. При этом концентрация продукта в среде значительно не влияла на содержание ГК внутри клеток. Также было продемонстрировано, что фиброциты по сравнению с молодыми фибробластами менее насыщены гиалуронатом.

После было проведено исследование влияние чистой гиалуроновой кислоты и её поперечно-сшитого геля в различных концентрациях на пролиферацию и морфологию фибробластов и фиброцитов. Морфологию фибробластов оценивали методом световой микроскопии. Клетки выращивались на покровных стеклах в среде, содержащей различные концентрации чистой ГК и продукта, до достижения конfluenceности 70% контрольного образца, выращенного в стандартной среде. Клетки фиксировались и окрашивались по Гимзе-Романовскому. Помимо сравнения морфологии клеток, просчитывалось содержание фиброцитов относительно общего количества клеток. Филлер и ГК приводят к «омоложению» фиброцитов, но существенно не влияют на морфологию фибробластов.

Исследование влияния филлера и ГК на пролиферацию клеток проводили двумя методами: МТТ-тест и проточная цитометрия. Для МТТ-теста клетки фибробласты и фиброциты выращивались в 96-ти луночных планшетах в средах с добавлением различных концентраций исследуемых веществ по 6 повторов каждой концентрации. Для проточной цитометрии клетки таким же методом выращивались в 6 луночных планшетах. Данное исследование продемонстрировало, что последним методом получают не слишком достоверные результаты из-за крайне малого количества клеток, которые, как правило, не дорастают до монослоя, а также обладают достаточно большим размером. С помощью МТТ-теста было продемонстрировано влияние различных концентраций исследуемых веществ на пролиферацию клеток.

В результате всех исследований было показано в полной мере, как исследуемые вещества в различных концентрациях влияют на пролиферацию, морфологию фибробласты и фиброциты кожи человека.

Список литературы

1. Bukhari S.N.A., Roswandi N.L., Waqas M., et al. Hyaluronic acid, a promising skin rejuvenating biomedicine: a review of recent updates and pre-clinical and clinical investigations on cosmetic and nutricosmetic effects // *Int J Biol Macromol*. 2018. Vol. 120-B. P. 1682–1695. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.18
2. Ивановская Е.В., Болдова А.Е., Сидорина А.Н., и др. Влияние поперечно сшитых продуктов гиалуроновой кислоты на пролиферацию фибробластов кожи человека в культуре // *Системная биология и физиология*. 2024. № 3. С. 20–25. EDN: TQCYEA
3. Vigetti D., Karousou E., Viola M., et al. Hyaluronan: Biosynthesis and signaling // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects*. 2014. Vol. 1840, N 8. P. 2452–2459. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.02.001

Ивлева А.И.¹ ✉, Бикмулина П.Ю.¹, Кошелева Н.В.¹, Тимашев П.С.^{1,2}

3D-биопечать с использованием органоидов и децеллюляризованного матрикса для создания релевантных тест-моделей *in vitro*

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Центр «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

✉ nastyaivleva0809@gmail.com

Аннотация. 3D-конструкты печени, напечатанные с использованием децеллюляризованного внеклеточного матрикса и органоидов, продемонстрировали улучшенные структурные и функциональные характеристики по сравнению с обычными органоидами, что подтверждает их преимущества для тестирования лекарственных препаратов.

Ключевые слова: 3D-биопечать; органоиды печени; внеклеточный матрикс; тканевая инженерия; биочернила; клеточные культуры; регенеративная медицина; биофабрикация; тканевые модели; моделирование печени.

Ivleva A.I.¹, Bikmulina P.Yu.¹, Kosheleva N.V.¹, Timashev P.S.^{1,2}

3D bioprinting using organoids and decellularized matrix to create relevant *in vitro* test models

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. Liver 3D constructs printed using decellularized extracellular matrix and organoids demonstrated improved structural and functional characteristics compared to regular organoids, confirming their advantages for drug testing.

Keywords: 3D bioprinting; liver organoids; extracellular matrix; tissue engineering; bioink; cell cultures; regenerative medicine; biofabrication; tissue models; liver modeling.

Печень, выполняя ключевые функции в организме, такие как поддержание метаболизма, детоксикация и синтез белков, является важным объектом для исследований в области регенеративной медицины [1]. Традиционные подходы к моделированию печени, такие как 2D-клеточные культуры и экспериментальные модели на животных, имеют значительные ограничения в воспроизведении трехмерной структуры и сложных межклеточных взаимодействий. Это приводит к недостаточной точности при оценке метаболизма и токсичности лекарственных препаратов [2].

В данном контексте технологии создания 3D-культур, в том числе биопечати, представляют собой более перспективный подход, так как позволяют воспроизвести межклеточные взаимодействия на новом уровне и с более высоким разрешением. Кроме того, включение децеллюляризованного внеклеточного матрикса (дВКМ) печени в состав гидрогеля для 3D-биопечати позволяет повысить гепатоспецифическую функциональную активность напечатанных конструктов [3]. Также более точно воспроизвести микроокружение печени возможно за счет использования органоидов вместо монокультурных сфероидов [4]. Целью данной работы стало исследование потенциала напечатанных конструктов печени и органоидов печени для исследования устойчивости к лекарственным препаратам.

Для создания трехмерных микроконструктов печени использовали биочернила на основе дВКМ печени, фибрина и желатина. Клеточный компонент включал органоиды, сформированные из трех типов клеток: линии гепатоцеллюлярной карциномы HepG2, эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и мезенхимных стромальных клеток пупочного канатика человека (МСК) в соотношении 3:2:1. Органоиды культивировали в течение трех дней, после чего использовали для биопечати (группа ВСО) или дальнейшего культивирования (группа СО).

Кондиционированную среду собирали на 1-й, 7-й, 14-й и 21-й дни культивирования для иммуноферментного анализа с целью определения уровня альбумина. На 18-й день органоиды подвергали воздействию диклофенака в концентрациях 250, 500 и 1000 мкМ в течение 72 часов для оценки цитотоксичности. Для оценки наличия и распределения специфических маркеров печени и паренхимы проводили иммуноцитохимический анализ.

В группе ВСО наблюдали более высокий уровень альбумина, что, вероятно, связано с активным разрастанием, слиянием органоидов и образованием тубулоподобных структур, напоминающих сосудистую сеть, что могло способствовать улучшению доставки питательных веществ и усилению метаболической активности.

При оценке цитотоксичности на 18-й день культивирования органоиды группы ВСО продемонстрировали повышенную устойчивость к диклофенаку, что может быть связано с более высокой степенью структурной организации по сравнению с группой СО. Иммуноцитохимический анализ показал также более выраженную экспрессию специфических маркеров печени в группе ВСО.

Наше исследование показало, что использование биочернил на основе дВКМ печени в сочетании с 3D-органоидами способствует созданию функционально активных и устойчивых моделей печени. Для напечатанных органоидов была выявлена более высокая степень структурной организации и метаболической активности, что подчеркивает важность дВКМ и 3D-условий для создания более точных и надежных систем тестирования лекарственных препаратов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках гранта соглашение № 075-15-2024-640 (Сеченовский Университет).

Список литературы

1. Ali A.S.M., Wu D., Bannach-Brown A., et al. 3D bioprinting of liver models: A systematic scoping review of methods, bioinks, and reporting quality // *Mater Today Bio*. 2024. Vol. 26. ID 100991. doi: 10.1016/j.mtbio.2024.100991
2. Wang H., Brown P.C., Chow E.C.Y., et al. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration // *Clin Transl Sci*. 2021. Vol. 14, N 5. P. 1659–1680. doi: 10.1111/cts.13066
3. Kim M.K., Jeong W., Kang H.W. Liver dECM-gelatin composite bioink for precise 3d printing of highly functional liver tissues // *J Funct Biomater*. 2023. Vol. 14, N 8. ID 417. doi: 10.3390/jfb14080417
4. Brooks A., Liang X., Zhang Y., et al. Liver organoid as a 3D *in vitro* model for drug validation and toxicity assessment // *Pharmacol Res*. 2021. Vol. 169. ID 105608. doi: 10.1016/j.phrs.2021.105608

Игнатьева М.В.^{1,2} ✉, Токтохоева Л.Н.^{1,2}, Дёмина Е.С.^{1,2}, Намсрайн С.Г.², Цыбденова А.П.^{2,3},
Дашинимаев Э.Б.⁴, Балханов Ю.С.^{2,3}

Роль лизата тромбоцитов человека в стимуляции пролиферации кератиноцитов при создании тканеинженерной конструкции

¹ Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова, Улан-Удэ, Россия

² ООО «Шэнэскин», Улан-Удэ, Россия

³ ООО «МИП «Байкальский центр биотехнологий», Улан-Удэ, Россия

⁴ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

✉ m_ignatieva@mail.ru

Аннотация. Исследование включало оценку эффективности использования лизата тромбоцитов для стимуляции роста кератиноцитов линии HaCaT в культуре. Данные клетки применялись для создания ранозаживляющего децеллюлированного продукта на основе коллагена I типа и продукта синтеза кератиноцитов — ламинина. Было обнаружено, что лизат тромбоцитов не обладает цитотоксическим действием и способствует получению клеточной биомассы. Кроме того, была продемонстрирована ранозаживляющая эффективность коллаген-ламининовой композиции на моделях полнослойных ран кожи у лабораторных животных.

Ключевые слова: коллаген I типа; кератиноциты человека линии HaCaT; лизат тромбоцитов человека; тканевая инженерия; ранозаживляющий материал.

Ignatieva M.V.^{1,2}, Toktokhоеva L.N.^{1,2}, Demina E.S.^{1,2}, Namsrain S.G.², Tsybdenova A.P.^{2,3},
Dashinimaev E.B.⁴, Balkhanov Yu.S.^{2,3}

The role of human platelet lysate in stimulating keratinocyte proliferation during the creation of a tissue-engineered construct

¹ Banzarov Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

² LLC "Sheneskin", Ulan-Ude, Russia

³ LLC "Baikal center of biotechnology", Ulan-Ude, Russia

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

Abstract. The study included an assessment of the effectiveness of platelet lysate for stimulating the growth of HaCaT keratinocytes in culture. These cells were used to create a wound-healing decellularized product based on type I collagen and a keratinocyte synthesis product, laminin. It was found that platelet lysate does not have a cytotoxic effect and promotes the production of cellular biomass. In addition, the wound-healing effectiveness of the collagen-laminin composition was demonstrated in models of full-thickness skin wounds in laboratory animals.

Keywords: collagen type I; human keratinocytes line HaCaT; human platelet lysate; tissue engineering; wound healing material.

Во всем мире сохраняется высокий уровень травматизма, обусловленного различными обстоятельствами, что включает в себя бытовые травмы, лесные пожары, техногенные катастрофы и военные конфликты. В таких условиях разработка новых биоматериалов для лечения ран кожи становится все более значимой задачей для медицинского сообщества [1, 2]. Один из наиболее многообещающих подходов к лечению и восстановлению поврежденных тканей включает в себя разработку резорбируемых тканеинженерных композиций с применением клеточных технологий. Данный подход предполагает не только трансплантацию живых клеток в зону поражения тканей, но и полное восстановление структуры и функций кожи, а также стимулирование процессов регенерации. Одной из ключевых задач клеточных технологий является поиск

оптимального состава сред для культивирования клеток, которые не содержат ксеногенных компонентов и могут быть использованы в клинической практике [3]. В научных исследованиях часто упоминается лизат тромбоцитов человека (hPL), который рассматривается как перспективная альтернатива эмбриональной телячьей сыворотке (FBS) в клеточных культурах [4, 5].

Целью данной работы было изучение влияния лизата тромбоцитов человека на пролиферативные, миграционные и метаболические процессы кератиноцитов линии HaCaT, культивируемых на коллагеновых матриксах, обладающих ранозаживляющими свойствами.

Лизат тромбоцитов был получен из лейкоредуцированного пулированного концентрата тромбоцитов, предоставленного Станцией переливания крови г. Улан-Удэ. После замораживания образцов с тромбоцитами при температуре -20°C их центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 15 минут, затем фильтровали, инкубировали при температуре 37°C , подвергали стерилизации гамма-облучением (15 кГр) и добавляли в бессывороточную среду с антибиотиками.

Пролиферативную активность, жизнеспособность кератиноцитов оценивали с помощью автоматического счетчика клеток BioRad TC20. Цитотоксичность лизата тромбоцитов изучали путем проведения МТТ-теста. Миграцию кератиноцитов оценивали на модели «нанесения царапины» на монослой клеток или «заживления раны». Масс-спектрометрический анализ гидролизатов препаратов тромбоцитов и коллагенов проводили с использованием базы UniProt.

В результате серии экспериментов было установлено, что при добавлении 10% лизата тромбоцитов в среду культивирования морфофизиологические характеристики клеток линии HaCaT (полигональные, размером до 25 мкм, с центрально расположенным ядром, с высокой пролиферативной активностью, сильной адгезией, способностью формировать монослой) оставались неизменными. В ходе мониторинга жизнеспособности, миграции и деления кератиноцитов линии HaCaT в процессе проведения теста «нанесение царапины» на монослой клеток было обнаружено, что использование 10% лизата тромбоцитов в качестве добавки к культуральной среде не имеет цитотоксического эффекта, способствует активации пролиферации и миграции кератиноцитов человека и аналогично по времени достижения конфлуентного состояния при культивировании с 10% эмбриональной телячьей сывороткой. Масс-спектрометрический анализ лизата тромбоцитов позволил идентифицировать 1766 пептидов, которые относятся к 130 белковым группам, к протеому тромбоцитов человека — 637 пептидов из 21 белковой группы.

В ходе анализа масс-спектрометрических данных последовательностей коллагенов было идентифицировано 519 пептидов, которые относились к 11 белковым группам. В этой смеси самой представительной группой белков были коллагены типа 1 цепи 1 и 2. Покрытия узкими пептидами данных белков составляли 50% и 45%, соответственно. Иммуногистохимический флуоресцентный анализ ранозаживляющего биоматериала выявил экспрессию композитных белков, таких как коллаген I типа и ламинин, а также панцитокератина, являющегося маркером эпителиальных клеток. Результаты исследования эффективности процесса децеллюляризации коллагеновой мембраны подтвердили, что количество жизнеспособных клеток на биоматериале не превышало установленных пороговых значений. Скорость регенерации полнослойной раны кожи у лабораторных животных служила критерием для оценки эффективности ранозаживляющего действия коллаген-ламининовой композиции. Видимые результаты были отмечены уже на пятые сутки проведения эксперимента.

Полученные результаты исследования позволяют рекомендовать лизат тромбоцитов в качестве альтернативы ксеногенной (эмбриональной телячьей) сыворотке при проведении процедур экспансии клеток *in vitro* и для создания биополимерных конструкций.

Список литературы

1. Алексеева Н.Т. Морфологические особенности раневого процесса в коже при региональном лечебном воздействии: дис. ... канд. мед. наук. 327 с. 2015.
2. Meleshina A.V., Bystrova A.S., Rogovaya O.S. et al. Skin tissue-engineering constructs and stem cells application for the skin equivalents creation (Review) // Современные технологии в медицине. 2017. Т. 9, № 1. С. 198–220. EDN: YIZWKF doi: 10.17691/stm2017.9.1.24

3. Романов Ю.А., Романов А.Ю. Ткани перинатального происхождения — уникальный источник клеток для регенеративной медицины. Часть I. Пуповинная кровь // Неонатология: Новости. Мнения. Обучение. 2018. Т. 6, № 2. С. 64–77. EDN: URMNQQ doi: 10.24411/2308-2402-2018-00019
4. Karadjian M., Senger A.S., Essers C., et al. Human platelet lysate can replace fetal calf serum as a protein source to promote expansion and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stromal cells // Cells. 2020. Vol. 9, N 4. ID 918. doi: 10.3390/cells9040918
5. Tanchaen W., Aungsuchawan S., Pothachoen P., et al. Human platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum for culture and endothelial differentiation of human amniotic fluid mesenchymal stem cells // Mol Med Rep. 2019. Vol. 19, N 6. P. 5123–5132. doi: 10.3892/mmr.2019.10182

Игнатьева Н.В.✉, Куренкова А.Д., Пацюркевич А.А., Мосина З.А., Гаврилов Н.С., Тимашев П.С., Медведева Е.В.

Оценка регенеративного потенциала хрящевых конструкторов на основе CD73⁺ хондропрогениторных клеток суставного хряща

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский университет)

✉ ignatava_n_v_1@staff.sechenov.ru

Аннотация. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* бескаркасные конструкторы из CD73⁺ клеток суставного хряща показали сопоставимое наличие хондрогенных маркеров и повышенное — маркеров гипертрофии по сравнению с конструкторами из хондроцитов. Восстановление дефекта суставного хряща *in vivo* было схожим во всех группах.

Ключевые слова: артикулярный хрящ; хондроциты; CD73⁺ прогениторные клетки; регенеративная медицина.

Ignatyeva N.V., Kurenkova A.D., Patsyurkevich A.A., Mosina Z.A., Gavrilov N.S., Timashev P.S., Medvedeva E.V.

Assessment of the regenerative potential of cartilage constructs based on CD73⁺ chondroprogenitor cells from articular cartilage

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Scaffold-free constructs made from CD73⁺ joint cartilage cells showed comparable levels of chondrogenic markers and higher levels of hypertrophic markers compared to constructs made from chondrocytes *in vitro* and *in vivo*. Restoration of the cartilage defect *in vivo* was similar across all groups.

Keywords: articular cartilage; chondrocytes; CD73⁺ progenitors; regenerative medicine.

Артикулярный хрящ подвержен разрушению вследствие травм и суставных дегенеративных заболеваний. Регенеративный потенциал гиалинового хряща сустава ограничен: в области остеохондрального дефекта сустава формируется фиброзный хрящ, хрящеподобная фиброзная ткань, механические свойства которой значительно уступают характеристикам интактного хряща. Хрящ состоит из одного типа клеток, хондроцитов, располагающихся в лакунах, окруженных коллагеновым матриксом, при этом хондроциты составляют менее 5% всего объема ткани. Применяемые на сегодня в клинической практике хирургические методы восстановления суставных поверхностей, включая клеточные терапии, не приводят к восстановлению функциональной хрящевой ткани в долгосрочной перспективе [1]. Относительно хорошую эффективность демонстрирует метод аутологичной трансплантации хондроцитов в область повреждения [1]. В лабораторных условиях работа с хондроцитами осложнена тем, что культивирование первичных хондроцитов ведёт к быстрой потере фенотипа, т.е. хондроциты перестают продуцировать хондрогенные маркеры и переходят в фибробластоподобные клетки. На сегодня известно, что поверхностная зона артикулярного хряща содержит популяцию резидентных хондропрогениторных клеток, способных продуцировать новые хондроциты *in vivo* [2, 3]. Популяцию хондропрогениторных клеток можно обнаружить и отделить от остальных хондроцитов по уникальному маркеру, поверхностному белку CD73 [4, 5]. Нашей задачей было оценить регенеративный потенциал CD73-положительной популяции клеток поверхностной зоны артикулярного хряща в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Первичные культуры хондроцитов были получены из тканей артикулярного хряща коленного сустава трёхмесячных крыс инбредной линии Wistar Kyoto. Первичные клетки были выделены из тканей с помощью ферментативной обработки протеолитическими ферментами. Методом клеточной сортировки на магнитных колонках MACS (magnetic-activated cell sorting) CD73⁺ прогениторные клетки были изолированы из пула хондроцитов суставного хряща. Поскольку

популяция CD73⁺ клеток в ткани артикулярного хряща крайне малочисленна, отсортированные прогениторы и хондроциты культивировались в монослойной культуре на протяжении трех пассажей. После экспансии для маркировки клетки 24 ч инкубировали с биосовместимыми наночастицами на основе оксида железа с флуоресцентной меткой. Затем меченые клетки центрифугировали и получали бескаркасные трехмерные культуры, состоящие из 3×10^5 клеток, которые впоследствии растили в хондрогенной среде. Хондрогенная ре-дифференцировка инициировалась при добавлении в хондрогенную культуральную среду фактора роста TGFβ3 (transforming growth factor β3). Для ингибирования перехода хондрогенных клеток в гипертрофированное состояние к среде добавляли IWP-2, ингибитор сигнального пути Wnt. По прошествии трёх недель культивирования, полученные трёхмерные хрящевые конструкторы были охарактеризованы на наличие специфичных маркеров зрелых хондроцитов, гипертрофированных хондроцитов и клеток фиброзной ткани с помощью методов ОТ-ПЦР и иммунофлуоресцентного окрашивания с антителами. Регенеративный потенциал исследуемых хрящевых конструкторов оценивали на модели локального остеохондрального дефекта коленного сустава крыс. Хрящевые конструкторы трансплантировали в область дефекта, располагающегося в межмышечковой ямке эпифиза бедренной кости коленного сустава самок крыс возрастом четыре месяца. Через 30 дней после операции животных вывели из эксперимента и извлекли коленные суставы. Полученные образцы были зафиксированы в 10% формалине, прошли декальцификацию и заморозку. Срезы образцов суставных тканей получали с помощью микротомы-криостата для дальнейшего сравнительного анализа методами гистологического и иммунофлуоресцентного окрашивания. Локализацию хрящевых имплантов на срезах тканей определяли по флуоресцентному сигналу наночастиц. Полученные хрящевые конструкторы экспрессировали маркеры гиалинового хряща во всех экспериментальных группах как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако в клеточных конструкторах, выращенных из CD73⁺ прогениторов, наблюдалось повышенное содержание маркеров гипертрофии и фиброзной ткани по сравнению с хондроцитами; присутствие ингибитора IWP2 в культуральной среде не способствовало снижению гипертрофии в значительной степени. Хрящевые конструкторы различались по локализации коллагена I: конструкторы, выращенные из CD73⁺ прогениторных клеток, содержали коллаген типа I преимущественно в зоне, близкой к поверхности, в то время как в хондроцитарных конструкторах фибриллярный белок был распределен равномерно по всему конструктору. Гистологическое окрашивание срезов тканей суставов крыс через месяц после трансплантации в область остеохондрального дефекта не выявило значимой разницы между конструкторами, выращенными из прогениторных клеток и хондроцитов. Данная работа способствует развитию клеточной терапии для лечения повреждений суставного хряща.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ № 21-75-10082).

Список литературы

1. Medvedeva E.V., Grebenik E.A., Gornostaeva S.N., et al. Repair of damaged articular cartilage: current approaches and future directions // *Int J Mol Sci*. 2018. Vol. 19, N 8. ID 2366. doi: 10.3390/ijms19082366
2. Kozhemyakina E., Zhang M., Ionescu A., et al. Identification of a Prg4-expressing articular cartilage progenitor cell population in mice // *Arthritis Rheumatol*. 2015. Vol. 67, N 5. P. 1261–1273. doi: 10.1002/art.39030
3. Ignatyeva N., Gavrillov N., Timashev P.S., Medvedeva E.V. Prg4-expressing chondroprogenitor cells in the superficial zone of articular cartilage // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 11. ID 5605. doi: 10.3390/ijms25115605
4. Kurenkova A.D., Li L., Usanova A.P., et al. Notch signaling regulates the chondrogenic potential of both articular chondrocytes and their progenitors during expansion // *Stem Cells*. 2023. Vol. 41, N 6. P. 658–671. doi: 10.1093/stmcls/sxad031
5. Li L., Newton P.T., Boudierlique T., et al. Superficial cells are self-renewing chondrocyte progenitors, which form the articular cartilage in juvenile mice // *FASEB J*. 2017. Vol. 31, N 3. P. 1067–1084. doi: 10.1096/fj.201600918R

Ираклионова Н.С.✉, Гилевич И.В., Басанкин И.В., Гюльзатян А.А., Грицаев И.Е., Таюрский Д.А.

Ортобиологические технологии в спинальной хирургии

ГБУЗ «Научно-исследовательский институт — Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского» МЗ КК,
Краснодар, Россия

✉ ins2904@rambler.ru

Аннотация. Для хирургического лечения большого спектра заболеваний и повреждений позвоночника применяются металлоконструкции, нестабильность которых является частым осложнением. По этой причине большое внимание уделяется ортобиологическим технологиям, направленным на стимуляцию остеосинтеза и регенерацию ткани.

Ключевые слова: тромбогель; остеопластика; костный дефект позвонков; нестабильность металлоконструкции.

Iraklionova N.S., Gilevich I.V., Basankin I.V., Giulzatyan A.A., Gritsaev I.E., Tayurski D.A.

Orthobiological technologies in spinal surgery

Research Institute — Regional Clinical Hospital No. 1 named after Prof. S.V. Ochapovsky, Krasnodar, Russia

Abstract. Hardware is used for the surgical treatment of a wide range of spinal diseases and injuries. Instability of hardware is a frequent complication. For this reason, much attention is paid to orthobiological technologies aimed at stimulating osteosynthesis and tissue regeneration.

Keywords: thrombin gel; osteoplasty; vertebral bone defects; instability of hardware.

Методика транспедикулярной фиксации широко применяется при хирургическом лечении большого спектра заболеваний и повреждений позвоночника. Нестабильность имплантированной металлоконструкции встречается в 4–20% случаев, а у пациентов с нарушением плотности костной ткани превышает 50% и является одной из основных причин снижения качества жизни и работоспособности [1, 2]. Предложенные стратегии аугментации винтов в основном имеют профилактический характер, а тактика лечения пациентов с костными дефектами позвонка вследствие расшатывания транспедикулярных винтов практически не разработана. Отсутствие тактики лечения пациентов с нестабильностью металлоконструкции обуславливает разработку новых способов остеопластики с использованием ортобиологических подходов.

Цель исследования — анализ эффективности и безопасности использования ортобиологического продукта при остеопластике костных дефектов позвонка с одномоментным реостеосинтезом.

В исследование по применению технологии аугментации винтов с использованием аллогенной кости, обогащенной тромбогелем, были включены 23 пациента (12 (52,2%) женщин, 11 (47,8%) мужчин) с нестабильностью металлоконструкции в виде ее расшатывания и остеолиза вокруг винтов. Средний возраст пациентов составил $60,3 \pm 8,78$ лет.

Распределение пациентов по первичной патологии: 16 (69,6%) — с дегенеративно-дистрофическими поражениями позвоночника, 4 (17,4%) — с травматическими повреждениями позвоночника, 2 (8,7%) — с болезнью Бехтерева, 1 (4,3%) — с хордой позвонка.

Ортобиологический подход включал применение двух компонентов. Первый компонент — костная стружка из интактной аллогенной головки бедренной кости — выполнял укрепляющую функцию. Второй компонент — аутологичный тромбогель (тромбин и плазма, обогащенная тромбоцитами (ОБТП)) — оказывал регенеративный эффект.

В качестве костной ткани была использована аллогенная головка бедренной кости, термически дезинфицированная с помощью специальной системы Lobator sd-2 (Telos, Германия) [3].

Аутологичный тромбогель готовили из периферической крови пациентов. На первом этапе получали ОБТП (первый компонент тромбогеля) путем двойного центрифугирования. ОБТП прошла контроль качества по уровню содержания тромбоцитов. На втором этапе из ОБТП готовили тромбин (второй компонент тромбогеля). Непосредственно перед применением в шприце смешивали равные объемы ОБТП и тромбина, отодвигали поршень в крайнее положение и через 15 секунд после формирования сгустка использовали полученный тромбогель.

Оперативное вмешательство включало в себя удаление винтов и остеопластику. Интраоперационно с использованием костной мельницы из головки бедренной кости готовили костную крошку и смешивали ее с тромбогелем. Готовой смесью заполняли поствинтовые дефекты кости, после чего устанавливали новые винты.

В раннем послеоперационном периоде по данным компьютерной томографии у 22 (95,7%) пациентов отмечалась интеграция регенеративного продукта и отсутствие признаков нестабильности реимплантированной металлоконструкции, 1 (4,3%) пациенту с болезнью Бехтерева проведен перемонтаж металлоконструкции. В послеоперационном периоде имплантат-ассоциированной инфекции не было выявлено ни у одного пациента.

Результаты лечения (предоперационные и послеоперационные инструментальные данные, клинические параметры) прослежены в течение 12 месяцев у 17 (73,9%) пациентов, в течение 6 месяцев — у 6 (26,1%) человек. У всех наблюдаемых пациентов применение предложенного ортобиологического подхода показало положительную динамику в виде статистически значимого регресса болевого синдрома в спине по визуальной аналоговой шкале ($p < 0,05$). Была отмечена положительная тенденция в виде снижения показателей индекса инвалидности Освестри (ODI) и улучшения качества жизни пациентов ($p < 0,05$). Рецидива заболевания в виде нестабильности конструкции не было зафиксировано ни в одном случае.

Таким образом, предложенный ортобиологический подход при остеопластике костных дефектов позвонка и аугментация винтов продемонстрировал свою первичную эффективность и безопасность.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках научно-инновационного проекта № НИП-20.1/22.24.

Список литературы

1. Mohi Eldin M.M., Ali A.M. Lumbar transpedicular implant failure: a clinical and surgical challenge and its radiological assessment // *Asian Spine J.* 2014. Vol. 8, N 3. P. 281–297. doi: 10.4184/asj.2014.8.3.281
2. Лебедев В.Б., Епифанов Д.С., Кинзягулов Б.Р., Зуев А.А. Передний спондилодез из мини-инвазивного ретроперитонеального доступа при лечении пациентов с псевдоартрозом после декомпрессивно-стабилизирующих операций по поводу дегенеративно-дистрофических заболеваний поясничного отдела позвоночника // *Хирургия позвоночника.* 2023. Т. 20, № 2. С. 57–64. EDN: YGGZRN doi: 10.14531/ss2023.2.57-64
3. Воробьев К.А., Божкова С.А., Тихилов Р.М., Черный А.Ж. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) // *Травматология и ортопедия России.* 2017. Т. 23, № 3. С. 134–147. EDN: ZRXJVT doi: 10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147

Исаева М.О.✉, Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Якушева Е.Н.

Стимулирующее действие янтарной кислоты на миогенез клеточной линии C2C12 через SUCNR1

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

✉ mia.poroshina@yandex.ru

Аннотация. Миогенез — это ключевой процесс формирования и восстановления мышечной ткани. В нашем исследовании на клетках-сателлитах мышечных миобластов C2C12 продемонстрировано, что янтарная кислота, являясь сигнальной молекулой, стимулирует миогенную дифференцировку через SUCNR1-Gai сигнальный путь.

Ключевые слова: миогенез; янтарная кислота; клеточная линия C2C12; SUCNR1.

Isayeva O.M., Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N.

Succinic acid stimulating effect on C2C12 cell line by SUCNR1 way

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. Myogenesis is a main process of muscle tissue formation and repair. Our research on satellite cells of mouse myoblasts C2C12 was demonstrated, that succinic acid, being a signaling molecule, stimulates myogenic differentiation through the SUCNR1-Gai signaling pathway.

Keywords: myogenesis; succinic acid; cell line C2C12; SUCNR1.

Миогенез — это сложный процесс формирования и развития миобластов, который играет ключевую роль в поддержании функциональности мышечной ткани, её способности к восстановлению и адаптации. Янтарная кислота, как метаболит цикла Кребса, имеет важное значение в энергетическом обмене клеток. Известно, что она также является сигнальной молекулой, действующей через сукцинатный рецептор 1 (SUCNR1), который участвует в регуляции метаболических реакций в почках, сердце, сетчатке глаза и других органах, тканях [1]. Понимание действия янтарной кислоты в скелетной мышечной ткани может раскрыть новые горизонты терапевтического воздействия на процесс регенерации и лечения различных заболеваний мышц.

Для исследования использовались клетки-сателлиты мышечных миобластов C2C12. В пролиферирующих клетках использовали питательную среду, содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки, и культивировали 7 дней. В качестве контроля использовали клетки, культивируемые на дифференцировочной среде, содержащей 2% лошадиной сыворотки на 1, 4, 7 день (ранний, средний, поздний этапы) [2]. Культивирование клеток с добавлением янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ в течение 1, 4, 7 дней. Внесение янтарной кислоты (100 мкМ) в сочетании с Pertussis toxin в концентрации 100 нг/мл (ингибитором SUCNR1-Gai сигнального пути, PT) [3] в течение 1, 4, 7 дней. Для каждой группы исследования проведено 3 повторения. Оценку дифференцировки клеток проводили, определяя индекс миогенеза (IM) по формуле:

$$IM = A - B/C - 1,$$

где A — количество ядер в многоядерных клеточных структурах, B — количество многоядерных клеточных структур, C — количество ядер в поле зрения [4]. Методом вестерн-блот определяли содержание SUCNR1 относительно GAPDH. Анализ результатов производили с помощью программ Stat Soft Statistica 13.0. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), парные сравнения оценивали по критерию Даннетта. Значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Для клеток до дифференцировки ИМ составил 0%. ИМ в контрольной группе возрастал соответственно сроку дифференцировки и составлял: 1 день — 15%, 4 день — 44%, 7 день — 77%. На раннем этапе дифференцировки ИМ при внесении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ возрастал на 420% ($p < 0,0001$) относительно клеток 1 дня дифференцировки. На 4 день дифференцировки ИМ увеличивался при добавлении янтарной кислоты (100 мкМ) относительно клеток среднего этапа миогенеза на 93,2% ($p < 0,0001$). Поздний этап дифференцировки при внесении янтарной кислотой в концентрации 100 мкМ характеризовался повышением ИМ на 20,8% ($p < 0,0001$) по сравнению с группой клеток 7 дня дифференцировки. Результаты свидетельствовали, что янтарная кислота ускоряет процесс миогенной дифференцировки. В зависимости от срока культивирования уровень SUCNR1 на 4 и 7 дни снижался относительно клеток 1 дня дифференцировки на 19,5% ($p = 0,001$) и на 15,9% ($p = 0,004$) соответственно, что указывает на участие SUCNR1 в миогенезе клеток линии C2C12. При действии янтарной кислоты (100 мкМ) на раннем этапе миогенеза уровень SUCNR1 снился на 22,5% ($p < 0,0001$) относительно клеток 1 дня дифференцировки. На среднем этапе относительное количество SUCNR1 при внесении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ статистически значимо снижалось на 32,7% ($p = 0,0002$) по сравнению с клетками 4 дня дифференцировки. Поздний этап миогенеза при добавлении янтарной кислоты (100 мкМ) также характеризовался снижением уровня SUCNR1 относительно клеток 7 дня дифференцировки на 11,1% ($p = 0,0006$). При совместном добавлении в питательную среду РТ (100 нг/мл) и янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ на раннем этапе наблюдалось возрастание ИМ на 213,3% ($p < 0,0001$) относительно 1 дня дифференцировки, при этом ИМ был ниже на 39,7% ($p < 0,0001$) по сравнению с серией янтарной кислоты (100 мкМ) без добавления РТ. ИМ при внесении янтарной кислоты в концентрации 100 мкМ с совместным добавлением РТ возрастал на 45,5% ($p = 0,004$) относительно 4 дня дифференцировки, при этом был статистически ниже по сравнению с самостоятельным действием янтарной кислоты. На позднем этапе РТ подавлял стимулирующее действие янтарной кислоты (100 мкМ) на клетки C2C12, ИМ не отличался от группы клеток 7 дня дифференцировки. На раннем этапе и позднем этапе дифференцировки применение коклюшного токсина препятствовало изменению уровня SUCNR1 под действием янтарной кислоты, данные показатели достоверно не отличались от значений клеток, культивируемых в дифференцировочной среде. На 4 день дифференцировки при воздействии РТ с янтарной кислотой в концентрации 100 мкМ относительное количество SUCNR1 снижалось на 20,0% ($p = 0,0191$) относительно применения дифференцировочной среды без янтарной кислоты.

Таким образом, уровень SUCNR1 снижается в процессе миогенеза и при экзогенном воздействии янтарной кислоты, что указывает на участие данного рецептора в регуляции регенерирующего процесса мышечной ткани. Ингибирование РТ показывает, что стимулирующее действие янтарной кислоты реализуется через SUCNR1-Gαi сигнальный путь.

Список литературы

1. Gilissen J., Jouret F., Pirotte B., Hanson J. Insight into SUCNR1 (GPR91) structure and function // *Pharmacol Ther.* 2016. Vol. 159. P. 56–65. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.008
2. Sin J., Andres A.M., Taylor D.J., et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts // *Autophagy.* 2016. Vol. 12, N 2. P. 369–380. doi: 10.1080/15548627.2015.1115172
3. Sundström L., Greasley P.J., Engberg S., et al. Succinate receptor GPR91, a Gα (i) coupled receptor that increases intracellular calcium concentrations through PLCβ // *FEBS letters.* 2013. Vol. 587, N 15. P. 2399–2404. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.067
4. Емелин А.М., Буев Д.О., Слабикова А.А., и др. Количественная оценка миогенной дифференцировки клеточной линии C2C12 с использованием полиэтиленгликоля и индукционных сред *in vitro* // *Гены и клетки.* 2019. Т. 14, № S. С. 87–87. EDN: CYNHVI

Калабушева Е.П. ✉, Бутова Е.А., Роговая О.С., Черкашина О.Л., Воротеляк Е.А.

YAP/TAZ в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов человека

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

✉ kalabusheva.e@gmail.com

Аннотация. Активация сигнального каскада YAP/TAZ способствует сохранению низкодифференцированного состояния эпидермальных кератиноцитов. Экспрессия YAP1 необходима для корректного протекания процессов дифференцировки.

Ключевые слова: YAP; TAZ; кожа; кератиноциты; дифференцировка.

Kalabusheva E.P., Butova E.A., Rogovaya O.S., Cherkashina O.L., Vorotelyak E.A.

YAP/TAZ in human epidermal keratinocytes differentiation

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. YAP/TAZ signaling activation promotes an undifferentiated state of epidermal keratinocytes. YAP1 expression is sufficient for proper epidermal differentiation.

Keywords: YAP; TAZ; skin; keratinocytes; differentiation.

Процессы регенерации и дифференцировки эпидермиса кожи находятся под контролем сети сигнальных каскадов, среди которых выделяют WNT, TGF β , SHH, Hippo, и др. Одним из центральных звеньев этих каскадов являются паралоги YAP и TAZ. Нарушения в паттерне экспрессии и активации YAP/TAZ ассоциированы со спектром патологических состояний, включающих псориаз, образование гипертрофических рубцов и канцерогенных заболеваний. В данном исследовании мы ингибировали и активировали сигнальный каскад YAP/TAZ для определения его роли в управлении дифференцировкой эпидермальных кератиноцитов.

В первой части исследования мы иммуногистохимически охарактеризовали паттерн активации YAP в эпидермисе кожи человека в норме и при различных патологиях. В коже здорового человека активная ядерная локализация YAP1 была обнаружена в единичных клетках базального слоя эпидермиса, внешнем корневом влагалище и матриксе волосяных фолликулов. В коже с выраженными фибротическими процессами активный YAP1 был выявлен во всех клетках базального слоя, однако при формировании хронических язв при остеомиелите YAP1-положительных ядер в эпидермисе обнаружено не было. Снижение активности YAP1 при этом было ассоциировано с исчезновением экспрессии кератинов 1 и 10, ассоциированных с дифференцировкой.

Далее *in vitro* на культурах первичных и иммортализованных кератиноцитов мы воздействовали на сигнальный каскад YAP/TAZ с целью его активации и ингибирования путем добавления химически-активных веществ и генетической модификации. Наши результаты показали, что подавление сразу двух паралогов YAP и TAZ не оказывало значительного эффекта на дифференцировку кератиноцитов ни при использовании ингибиторов вертепорфина и пептида 17, ни при генетическом подавлении их экспрессии посредством системы CRISPR/Cas9 и shRNA. Однако нарушение экспрессии только одного паралога, YAP или TAZ, приводило к снижению экспрессии маркеров базального слоя — низкодифференцированного состояния кератиноцитов, и повышению экспрессии кератинов, типичных для более специализированного состояния. Активацию сигнального каскада YAP/TAZ проводили путем воздействия ингибитора LATS-киназы, участника каскада Hippo, контролирующего процесс дегградации YAP и TAZ в цитоплазме. Добавление LATSi приводило

к повышению экспрессии маркеров базального слоя; экспрессия кератинов 1 и 10 снижалась на уровне РНК, однако не изменялась на уровне белка.

Полученные данные указывают на существенную роль транскрипционных кофакторов YAP и TAZ в протекании дифференцировки эпидермальных кератиноцитов. Результаты экспериментов *in vitro* указывают на более интенсивную степень дифференцировки эпидермальных кератиноцитов при подавлении активности сигнального каскада YAP/TAZ и сохранение маркеров базального герминативного слоя при его гиперактивации. Анализ биопсий указывает на важность активности этого сигнального пути для корректного протекания процессов эпидермальной стратификации. Таким образом, вещества, модулирующие активность YAP/TAZ обладают значительным потенциалом в качестве средств терапии нарушений ранозаживления.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-74-30015).

Калинина Н.И.

Макрофаги в поддержании клеточного состава тканей

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ n_i_kalinina@mail.ru

Аннотация. Макрофаги представляют собой чрезвычайно гетерогенную популяцию клеток, необходимых для эффективного восстановления поврежденных тканей. Важнейшими партнерами макрофагов являются клетки стромы. Взаимодействие этих клеток может играть центральную роль в определении исхода регенерации.

Ключевые слова: гетерогенность макрофагов; пластичность; миграция; поляризация; клетки стромы.

Kalinina N.I.

Macrophages in the tissue homeostasis maintenance

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Macrophages represent extremely heterogeneous cells, which are necessary for effective regeneration of the damaged tissues. Stromal cell, including fibroblasts are the most important partners of fibroblasts. Interaction of these cells could play a central role in defining the regeneration outcome.

Keywords: macrophage heterogeneity; plasticity; migration; polarization; fibroblastic lineage.

Регенерация во многом зависит от эффективности взаимодействия клеток поврежденной ткани с иммунными клетками. Центральная роль в таком взаимодействии принадлежит макрофагам. Эти клетки необходимы как для ранних этапов ответа на повреждение, так и для последующего ремоделирования (созревания) восстановленной ткани. Так, на ранних этапах ответа на повреждение макрофаги продуцируют широкий спектр хемокинов и цитокинов, что активирует привлечение иммунных клеток в участок повреждения. Эти же клетки необходимы и для последующего подавления воспаления, восстановления кровеносного русла и ремоделирования ткани. В настоящее время считается, что многогранная, комплексная роль макрофагов в восстановлении тканей обусловлена как онтогенетическим разнообразием этих клеток, так и их пластичностью. Нарушение активности макрофагов может приводить к задержке регенерации, фиброзу и развитию хронического воспаления. Взаимодействие макрофагов с клетками восстанавливающейся ткани, прежде всего фибробластами и эндотелиальными клетками, определяет их функциональную активность, а, следовательно, и исход регенерации. В связи с этим для успешного, полноценного восстановления клеточного состава ткани необходим точный контроль популяционной динамики макрофагов в очаге регенерации.

Калинин А.П.^{1,2} ✉, Зубкова Е.С.¹, Меньшиков М.Ю.¹, Парфёнова Е.В.^{1,2}

Роль интегрированного стрессорного ответа в развитии сенесценции мезенхимальных стволовых клеток

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. ак. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия

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

✉ alexanderpkalinin@gmail.com

Аннотация. На сегодня клеточное старение остаётся малоизученным состоянием, не поддающимся эффективному и безопасному лечению. Мы расширили понимание сенесценции, описав роль нескольких эффекторов интегрированного стрессорного ответа и его модуляторов в развитии сенесценции мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; клеточное старение; сенесценция; интегрированный стрессорный ответ.

Kalinin A.P.^{1,2}, Zubkova E.S.¹, Menshikov M.Yu.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,2}

The role of the integrated stress response in the development of mesenchymal stem cell senescence

¹ National Medical Research Centre of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Cellular senescence remains a poorly understood condition with no effective and safe treatment. Our research expands an understanding of senescence by describing the role of several effectors of the integrated stress response and its modulators in the development of mesenchymal stem cell senescence.

Keywords: mesenchymal stem cells; aging; cellular senescence; integrated stress response.

Клеточное старение или сенесценция лежит в основе патофизиологии различных заболеваний и старения организма в целом и характеризуется провоспалительным фенотипом в сочетании с необратимой остановкой клеточного цикла, что является фатальным событием для мезенхимальных стволовых клеток (МСК), составляющих значительную долю регенеративного потенциала организма. На сегодняшний день не существует универсального маркера сенесцентных клеток, а также отсутствуют препараты, способные безопасно и эффективно элиминировать стареющие клетки. Это создает чрезвычайную необходимость в более глубоком изучении процесса сенесценции и разработке высокоспецифичных анти-сенесцентных препаратов. Малоизученным в контексте клеточного старения является сигналинг интегрированного стрессорного ответа (ИСО) — фундаментальный клеточный механизм, индуцирующийся различными триггерами, такими как стресс эндоплазматического ретикулаума или вирусные инфекции. Центральным звеном ИСО является фосфорилирование эукариотического фактора инициации трансляции 2 альфа (eIF2 α), что ограничивает глобальный синтез белков и запускает трансляцию определённых транскрипционных факторов: фактора активации транскрипции-4 (ATF4) и -3 (ATF3). ИСО в первую очередь является защитным механизмом, «гибернирующим» клетку на время преодоления стрессорного воздействия. С другой стороны, избыточный стресс может приводить к ИСО-индуцированному апоптозу клетки посредством индукции трансляции, например, фактора СНОР. К настоящему моменту разработаны различные соединения-модуляторы ИСО. К таким можно отнести салубринал, потенцирующий ИСО, и ингибитор интегрированного стрессорного ответа (ISRIB). В своём исследовании мы использовали две основные модели клеточного

старения — индуцированного окислительным стрессом (обработка пероксидом водорода) и повреждением ДНК (обработка доксорубицином). Мы продемонстрировали, что обработка сенесцентных МСК салубрином ослабляет активность ассоциированной с сенесценцией бета-галактозидазы (SA- β Gal), ограничивает трансляцию ингибитора циклин-зависимых киназ p21 и молекул из состава секреторного фенотипа, ассоциированного с сенесценцией (SASP). В то же время ISRIB оказывает противоположные эффекты, усугубляя сенесцентное состояние МСК. Кроме того, с помощью набора для подсчёта клеток 8 (CCK8) мы показали, что салубринал способен оказывать цитотоксическое действие на сенесцентные МСК, не оказывая подобного эффекта в отношении здоровых МСК, что делает салубринал потенциальным сенолитиком — веществом, специфично разрушающим сенесцентные клетки. Пик отрицательного эффекта сенесцентных клеток приходится на хронизацию данного патологического состояния, когда клетки иммунной системы вследствие функциональной недостаточности, в том числе старения (иммуносенесценция), неспособны в должной степени реагировать на выделяемые сенесцентной клеткой хемоаттрактанты и многие другие факторы, входящие в состав SASP [1]. Согласно концепции М.В. Благосклонного [2] состояние сенесценции трактуется, как гипермитогенная остановка клеточного цикла, когда клетка, получая недостаточное для запуска апоптоза стрессорное воздействие извне, приобретает сенесцентное состояние в сочетании с активной секрецией различных факторов, причём данное состояние в отсутствии иммунного ответа становится хроническим, истощая клетку. Наши результаты подтверждают концепцию Благосклонного, поскольку мы показали, что репрессия трансляционного аппарата сенесцентных МСК посредством активирующего действия салубринала на ИСО ограничивает синтез SASP-факторов, и, как мы предполагаем, активированный ИСО может перенаправлять сенесценцию либо в сторону индукции апоптоза, либо гибернации для защиты от стресса вместо истощения клетки. Тем не менее, роль ИСО в клеточном старении требует более детального и всестороннего изучения, а имеющиеся на сегодня литературные данные сулят большие перспективы в использовании модуляторов ИСО в качестве потенциальных анти-сенесцентных препаратов [3].

Список литературы

1. Liu Z., Liang Q., Ren Y., et al. Immunosenescence: Molecular mechanisms and diseases // *Signal Transduct Target Ther.* 2023. Vol. 8. ID 200. doi: 10.1038/s41392-023-01451-2
2. Blagosklonny M.V. Cell senescence and hypermitogenic arrest // *EMBO Rep.* 2003. Vol. 4. P. 358–362. doi: 10.1038/sj.embor.embor806
3. Kalinin A., Zubkova E., Menshikov M. Integrated stress response (ISR) pathway: Unraveling its role in cellular senescence // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 24. ID 17423. doi: 10.3390/ijms242417423

Калинин К.Т.¹ ✉, Седуш Н.Г.¹, Малахов С.Н.¹, Крупнин А.Е.¹, Спиринов О.А.², Аганесов А.Г.², Чвалун С.Н.¹

Нанесение гидроксиапатитного покрытия на поверхность пористых PLA скаффолдов, полученных методом 3D-печати

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

✉ kalininkt@yandex.ru

Аннотация. Предложены различные методы нанесения биоактивных покрытий на основе гидроксиапатита на полилактидные 3D-скаффолды. Описанные подходы могут быть использованы для повышения гидрофильности и шероховатости скаффолдов с целью улучшения адгезии и дифференцировки клеток.

Ключевые слова: скаффолды; 3D-печать; тканевая инженерия; кость; поли(ε-капролактон); полилактид; гидроксиапатит.

Kalinin K.T.¹, Sedush N.G.¹, Malakhov S.N.¹, Krupnin A.E.¹, Spirin O.A.², Aganesov A.G.², Chvalun S.N.¹

Surface modification of 3D-printed porous PLA scaffolds BY hydroxyapatite

¹ National Research Centre Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. Various methods for surface modification of polylactide 3D-scaffolds by hydroxyapatite-based coatings are proposed. The described approaches can be used to increase the hydrophilicity and roughness of scaffolds in order to improve cell adhesion and differentiation.

Keywords: Scaffolds; 3D-printing; tissue engineering; bone; poly(ε-caprolactone); polylactide; hydroxyapatite.

С развитием аддитивных технологий появилась возможность изготовления более совершенных скаффолдов для регенеративной медицины, обладающих контролируемой пористостью и сложным дизайном. При этом сохраняются трудности с контролем свойств поверхности, такими как шероховатость или микропористость. Поверхностные свойства скаффолда могут влиять на такие важные характеристики, как адгезия и дифференцировка клеток, выраженность воспалительной реакции и др. [1]. К тому же, широко используемые для изготовления скаффолдов полиэфирные полилактиды (полилактид, поли-ε-капролактон), являются гидрофобными полимерами и могут вызывать воспалительную реакцию при контакте с окружающими тканями [2]. Решением вышеперечисленных проблем является модификация поверхности различными физико-химическими способами, например обработка плазмой, щелочью, сывороткой и др. Наиболее популярным из этого ряда является физическая адсорбция биологически активных соединений на поверхности изделия, например гидроксиапатита [3]. Гидроксиапатит (ГАП) является основной минеральной составляющей костной ткани, который благодаря своим биоактивным свойствам широко используется в качестве покрытий, а также наполнителя в композиционных материалах [4, 5]. Более того, за счет щелочных свойств ГАП дополнительно способствует нейтрализации среды при формировании кислых продуктов гидролиза полиэфиров. Таким образом, целью настоящей работы была разработка методики нанесения прочного устойчивого покрытия на основе гидроксиапатита на поверхность PLA-скаффолда.

На первом этапе работы методом 3D-печати были изготовлены гироидные скаффолды на основе коммерческого полилактида eSun PLA+ с пористостью 58%. В качестве методов нанесения покрытия гидроксиапатита были выбраны четыре подхода:

- 1) нанесение гидроксиапатита без дополнительного добавления связующего агента; и с добавлением связующего;
- 2) линейного высокомолекулярного поли-D,L-лактида (PDLLA);
- 3) низкомолекулярного 6-лучевого олигомера ϵ -капролактона с последующим УФ-отверждением;
- 4) N-винилпирролидона с последующим УФ-отверждением. Морфологию полученных покрытий исследовали методом сканирующей электронной микроскопии.

Покрытие на основе гидроксиапатита, полученное 1-м методом, представляло собой сплошной слой с большим количеством трещин, что обуславливается хрупкостью слоя. Гидроксиапатит на поверхности скаффолда удерживается только за счет физической адсорбции, и покрытие разрушается при незначительной нагрузке.

Модификация поверхности по 2-му методу предполагает добавление линейного высокомолекулярного поли-(DL)лактида ($M_w = 200$ кДа) в качестве связующего агента. Соотношение гидроксиапатита к полилактиду варьировали от 20 до 80 масс.%. Покрытия на образцах, в которых превалирует PDLLA, представляет собой сплошной полимерный слой с редкими вкраплениями крупных кристаллов гидроксиапатита с размером от 10 до 50 мкм. По сравнению с исходным скаффолдом значительно увеличилась шероховатость поверхности.

Звездообразный УФ-отверждаемый 6-лучевой олиго(ϵ -капролактон) ($M_w = 37$ кДа) использовали в качестве связующего агента при реализации 3-го метода. По сравнению с линейными высокомолекулярным поли-(DL)лактидом он обладает намного более низкой вязкостью, что может способствовать проникновению суспензии даже в зоны соединения между печатными слоями. При достаточно высоком соотношении ГАП : олигомер = 80 : 20 образовался довольно прочный слой, который не разрушался при нагрузке. Покрытие характеризуется более однородным распределением ГАП по сравнению со 2-м методом. К тому же, за счет более низкой вязкости связующего, этот метод открывает возможность модифицировать скаффолды с меньшим размером пор, что невозможно при использовании линейных высокомолекулярных полимеров.

В 4-м методе в качестве связующего агента использовали УФ-отверждаемый N-винилпирролидон, формирующий водорастворимое покрытие на поверхности скаффолда. Установлено, что при соотношении ГАП : поли(N-винилпирролидон) = 80 : 20 покрытие содержит большое количество трещин и разрушается даже от незначительной нагрузки.

Таким образом, можно выделить 2 метода модификации поверхности полилактидных скаффолдов, которые представляются наиболее перспективными: использование высокомолекулярного поли-(DL)лактида (соотношение ГАП : поли-(DL)лактид = 60 : 40) и использование низкомолекулярного 6-лучевого олигомера ϵ -капролактона (соотношение ГАП : олиго-(ϵ -капролактон) = 80 : 20). Оба подхода обеспечивают образование прочного композиционного покрытия с минимальным количеством дефектов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках госзадания РНЦХ им. Б.В. Петровского FURG-2022-0010 (договор №665-ЭА-24-НИР от 14.06.2024). Для изготовления скаффолдов использовано оборудование Центра аддитивных и виртуальных технологий НИЦ «Курчатовский институт». Исследования методом сканирующей электронной микроскопии проведены в РЦ «ОПТИКА» НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Singhvi R., Stephanopoulos G., Wang D.I. Effects of substratum morphology on cell physiology // *Biotechnol Bioeng.* 1994. Vol. 43, N 8. P. 764–771. doi: 10.1002/bit.260430811
2. Baran E.H., Erbil H.Y. Surface modification of 3D printed PLA objects by fused deposition modeling: A review // *Colloids and Interfaces.* 2019. Vol. 3, N 2. ID 43. doi: 10.3390/colloids3020043
3. Lee S.J., Lee D., Yoon T.R., et al. Surface modification of 3D-printed porous scaffolds via mussel-inspired polydopamine and effective immobilization of rhBMP-2 to promote osteogenic differentiation for bone tissue engineering // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 40. P. 182–191. doi: 10.1016/j.actbio.2016.02.006

Каменков С.С. ✉, Кулебякин К.Ю., Антропова Ю.Г., Зиновьева А.А., Бахчинян Е.,
Тюрин-Кузьмин П.А., Чечехина Е.С.

Изменение распределения PTEN в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках при старении

Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова,
Москва, Россия

✉ kams200303@gmail.com

Аннотация. PTEN, ингибитор инсулинового сигнального каскада и регулятор клеточного цикла, накапливается в ядре стареющих мезенхимных стволовых клеток, что может играть роль в адаптации клеток к старению.

Ключевые слова: мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; старение; PTEN; ядро; цитоплазма.

Kamenkov S.S., Kulebyakin K.Yu., Antropova Yu.G., Zinoveva A.A., Bakhchinyan E.,
Tyurin-Kuzmin P.A., Chechekhina E.S.

Aging related changes in pten distribution in multipotent mesenchymal stromal cells

Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. PTEN, an inhibitor of the insulin signaling cascade and a regulator of the cell cycle, accumulates in the nucleus of aging mesenchymal stem cells, which may play a role in the cells' adaptation to aging.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells; aging; PTEN; nucleus; cytoplasm.

Мезенхимные мультипотентные стромальные клетки (МСК) — разновидность постнатальных стволовых клеток человека, располагающаяся в строме большинства тканей. Данные клетки необходимы для поддержания гомеостаза ткани за счет своей способности секретировать различные регуляторные молекулы, а также благодаря дифференцировке в клетки соединительных тканей [1]. Сами МСК также подвержены регуляции. Одним из основных физиологических регуляторов адипогенной дифференцировки МСК является инсулин. В пожилом возрасте часто происходит нарушение чувствительности к инсулину, приводящие к нарушению обновления жировой ткани и метаболическому синдрому. Ранее было показано, что развитие инсулинорезистентности МСК при старении обусловлено повышенным базальным уровнем активации MAPK/Erk и PI3K/Akt, являющихся каноническими инсулин-зависимыми сигнальными каскадами. Данный эффект связан с паракринным влиянием сенесцентных клеток на свое окружение за счёт внеклеточных везикул и содержащихся в них микроРНК [2]. Одной из мишеней найденных в составе внеклеточных везикул сенесцентных клеток микроРНК является белок-ингибитор PI3K/Akt инсулинового каскада PTEN. Помимо цитоплазматического PTEN, функция которого заключается преимущественно в регуляции PI3K/Akt-сигнального каскада, существует ядерная фракция PTEN, необходимая для поддержания стабильности генома и регуляции клеточного цикла [3, 4].

Целью данного исследования было изучение изменения уровня PTEN и его распределения в мезенхимных мультипотентных стромальных клетках при старении.

В качестве модели старения МСК нами использовались клетки, выделенные из доноров старше 65 лет (сенесцентные клетки). Контрольными МСК были клетки молодых здоровых доноров на ранних пассажах. Для оценки уровня экспрессии белка PTEN в сенесцентных и молодых МСК мы лизировали тотальную популяцию клеток. Измерение уровня белка проводили с помощью Вестерн-блоттинга с нормировкой

на GAPDH и Vinculin. Используя данный метод, мы показали, что в сенесцентных МСК происходило повышение тотального уровня экспрессии белка ингибитора инсулинового каскада PTEN. Поскольку в этих же популяциях клеток ранее мы наблюдали высокий базальный уровень pAkt и pErk1/2 — ключевых участников канонических инсулиновых каскадов, было выдвинуто предположение о повышении PTEN за счёт ядерной фракции.

Используя иммунофлуоресцентный анализ и конфокальную микроскопию, мы показали, что в сенесцентных МСК по сравнению с молодыми клетками повышен уровень PTEN в ядре. При этом в сенесцентных клетках также росло соотношение уровня PTEN в ядре к уровню данного белка в цитоплазме. Полученные результаты также были подтверждены с помощью Вестерн-блоттинга после разделения ядерной и цитоплазматической белковых фракций методом высаливания. Эти данные свидетельствуют о том, что при старении уровень PTEN в клетке повышался за счет ядерной фракции, а не цитоплазматической.

Таким образом, мы показали, что при старении МСК происходит увеличение экспрессии белка PTEN за счет ядерной фракции. Наблюдаемые изменения могут быть одним из механизмов адаптации клеток при старении.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ (Грант № 19-75-30007, Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека. <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

Список литературы

1. Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease // *Nat Rev Immunol.* 2008. Vol. 8, N 9. P. 726–736. doi: 10.1038/nri2395
2. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O. Declined adipogenic potential of senescent MSCs due to shift in insulin signaling and altered exosome cargo // *Front Cell Dev Biol.* 2022. Vol. 10. ID 1050489. doi: 10.3389/fcell.2022.1050489
3. Planchon S., Waite K., Eng C. The nuclear affairs of PTEN // *J Cell Sci.* 2008. Vol. 121, N 3. P. 249–253. doi: 10.1242/jcs.022459
4. Yin Y., Shen W.H. PTEN: a new guardian of the genome // *Oncogene.* 2008. Vol. 27. P. 5443–5453. doi: 10.1038/onc.2008.241

Каменцева Р.С.¹✉, Кошеверова В.В.¹, Харченко М.В.¹, Корнилова Е.С.^{1,2}

Аутофагия в эндометриальных мезенхимных стромальных клетках человека в разных условиях культивирования

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ rkamentseva@incras.ru

Аннотация. Оценены уровни аутофагии в эндометриальных мезенхимных стромальных клетках человека при различных условиях культивирования. На модели лиганд-опосредованного эндоцитоза рецептора эпидермального фактора роста показано, что аутофагия может конкурировать с деградацией интернализуемых рецепторов.

Ключевые слова: аутофагия; эндоцитоз; рецептор эпидермального фактора роста; мезенхимные стволовые клетки эндометрия.

Kamentseva R.S.¹, Kosheverova V.V.¹, Kharchenko M.V.¹, Kornilova E.S.^{1,2}

Autophagy in human endometrial mesenchymal stromal cells under different culture conditions

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Autophagy levels in human endometrial mesenchymal stromal cells were assessed under various culture conditions. Also it was shown that autophagy may compete with the degradation of epidermal growth factor receptor during ligand-mediated endocytosis.

Keywords: autophagy; endocytosis; epidermal growth factor receptor; endometrial mesenchymal stem cells.

Ранее мы показали, что для эндометриальных мезенхимных стромальных клеток (энМСК) человека, характерна медленная динамика лиганд-опосредованной деградации рецептора эпидермального фактора роста (рЭФР) по сравнению с широко используемыми для исследования эндоцитоза рЭФР линиями клеток, таких как HeLa и A549 [1]. Известно, что комплексы белков, регулирующие созревание эндосом и их слияние с лизосомами, такие как PI3KC3, ESCRT и HOPS, также участвуют и в аутофагии [2]. Причём белковый состав комплекса PI3KC3 в этих двух процессах различается, что может приводить к конкуренции за компоненты машинерии между эндо- и аутофагосомами [3].

Целью данной работы было исследовать вклад аутофагии в динамику лиганд-опосредованной деградации рЭФР в энМСК человека.

С помощью иммунофлуоресцентного анализа количества LC3-везикул, а также иммуноблотинга с выявлением LC3 и p62 мы оценили уровни аутофагии в различных условиях культивирования.

Оказалось, что стимуляция аутофагии может происходить даже при замене старой культуральной среды на свежую, которая часто включена в дизайн экспериментов по исследованию ростовых факторов. Добавление ЭФР без смены среды в самом деле приводило к более быстрой деградации рЭФР, что говорит в пользу предположения о конкуренции аутофагии и эндоцитоза. При этом колокализации между LC3 и везикулами, содержащими флуоресцентно-меченый ЭФР, не наблюдалось, что говорит о разграничении рецептор-опосредованного эндоцитоза и аутофагии в клетке.

Стоит отметить, что при культивировании в среде другого производителя выраженной стимуляции аутофагии при смене среды не наблюдалось. Таким образом, МСК могут быть чувствительны к большому

числу факторов окружающей среды, влиянию которых обычно не придаётся большого значения (уровень pH, изменение уровня глюкозы при смене среды на свежую или секреция клетками различных веществ). При этом аутофагия может влиять на другие процессы в клетке, в связи с чем стоит тщательно планировать дизайн эксперимента и аккуратно интерпретировать полученные данные.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00335.

Список литературы

1. Kamentseva R.S., Kharchenko M.V., Gabdrahmanova G.V., et al. EGF, TGF- α and amphiregulin differently regulate endometrium-derived mesenchymal stromal/stem cells // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 17. ID 13408. doi: 10.3390/ijms241713408
2. Birgisdottir Á.B., Johansen T. Autophagy and endocytosis–interconnections and interdependencies // *J Cell Sci*. 2020. Vol. 133, N 10. ID jcs228114. doi: 10.1242/jcs.228114
3. Bilanges B., Posor Y., Vanhaesebroeck B. PI3K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019. Vol. 20, N 9. P. 515–534. doi: 10.1038/s41580-019-0129-z

Каминская Я.П. ✉, Ильчибаева Т.В., Науменко В.С., Цыбко А.С.

Влияние секреции дофаминового нейротрофического фактора мозга (CDNF) на его нейротрофные свойства

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ yanka2410@gmail.com

Аннотация. Создана конститутивно секретируемая модификация нейротрофического фактора CDNF, которая оказывает выраженное нейротрофное действие в культуре клеток нейробластомы и улучшает моторные функции мышей линии Prnp-SNCA*^{A53T} при сверхэкспрессии в чёрной субстанции.

Ключевые слова: нейротрофические факторы; дофаминовый нейротрофический фактор мозга (CDNF); болезнь Паркинсона.

Kaminskaya Ya.P., Ilchibaeva T.V., Naumenko V.C., Tsybko A.C.

The effect of cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) secretion on its neurotrophic properties

Institute of cytology and genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. A constitutively secreted modification of the neurotrophic factor CDNF has been created, which has a pronounced neurotrophic effect in a neuroblastoma cell culture and improves the motor functions of Prnp-SNCA*^{A53T} mice when overexpressed in the substantia nigra.

Keywords: neurotrophic factors; cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF); Parkinson's disease.

Дофаминовый нейротрофический фактор мозга (cerebral dopamine neurotrophic factor — CDNF) был открыт в 2007 году, но с тех пор привлек большое внимание исследователей. Особенностью CDNF среди других нейротрофических факторов является отсутствие известных специфических рецепторов на клеточной мембране и преимущественная локализация в ЭПР, который он может покидать в условиях сильного клеточного стресса [1]. Было неоднократно продемонстрировано, что введение рекомбинантного белка CDNF, или аденоассоциированного (AAV) конструктора, обеспечивающего сверхэкспрессию CDNF, защищало и восстанавливало дофаминовые нейроны в различных фармакологических моделях болезни Паркинсона (БП) [2].

В наших знаниях о механизмах функционирования CDNF по-прежнему остается достаточно много пробелов. Одна из таких малоисследованных областей — зависимость свойств CDNF от его внутри- и внеклеточной локализации. Ранее уже были предприняты некоторые попытки по установлению свойств и механизма действия секретируемого CDNF. Известно, что последовательность KTEL на С-конце CDNF ответственна за удержание CDNF в просвете ЭПР [3]. При этом ранее было показано, что удаление этого мотива закономерно приводит к большей секреции CDNF, но также лишает его цитопротекторной активности. На культуре клеток было показано, что CDNF лишенный KTEL последовательности перестает защищать клетки от стресса ЭПР, вызванного обработкой тапсигаргином [4].

Возникает некоторое противоречие, так как при обработке клеток рекомбинантным CDNF нейропротекторное действие также имеет место. Поскольку уже идут клинические испытания рекомбинантного белка CDNF на добровольцах с болезнью Паркинсона (завершена I фаза) [5], возникает острая необходимость во всестороннем исследовании эффектов, оказываемых CDNF, в том числе его секретируемой формой.

Таким образом, целью настоящей работы является исследование влияния секреции нейротрофического фактора CDNF на его нейропротекторные и нейротрофные свойства.

Нами был сконструирован мутантный CDNF (CDNF_mut) путём замены его сигнального пептида на сигнальный пептид куриного лизоцима, что позволило добиться конститутивной секреции CDNF во внеклеточную среду.

Чтобы оценить влияние секретрируемой формы CDNF на морфологию клеток, в частности, на удлинение нейрональных отростков, мы трансфицировали клетки нейробластомы N1E-115 векторной плазмидой pCDNA, плазмидой кодирующей CDNF и CDNF_mut. Нами было выявлено, что секретрируемый CDNF увеличивает процент клеток с длиной отростков, превышающей длину тела клеток в 2 и более раза.

Далее с помощью аденоассоциированного вирусного вектора была индуцирована сверхэкспрессия CDNF_mut в черной субстанции шестимесячных мышей линии Prnp-SNCA*A53T, являющихся генетической моделью БП. Через четыре недели после стереотаксической инъекции конструктора AAV-CDNF_mut был проведен ряд поведенческих тестов. Сверхэкспрессия секретрируемого CDNF не повлияла на латентное время падения в тесте Rotarod. Вместе с тем животные из группы AAV-CDNF_mut показали большую силу хвата в тесте Grip Strength и достоверно большее время удержания при подвешивании на металлическом стержне в тесте Wire Hanging. В тесте «Открытое поле» сверхэкспрессия секретрируемого CDNF оказала небольшое влияние на исследовательскую активность, что отразилось в увеличении числа вертикальных стоек на уровне сильной тенденции. Эффектов на двигательную активность и тревожное поведение (время в центре арены) не выявлено, однако животные из экспериментальной группы демонстрировали значительно большее число умываний, что в нашем случае является скорее проявлением гигиенического поведения, а не тревожности как таковой.

В данном исследовании также была предпринята попытка определить молекулярные каскады, модуляцию которых может вызывать секреция CDNF. Было установлено, что сверхэкспрессия CDNF_mut привела к росту экспрессии гена *Creb*, что, однако, не отразилось на уровне кодируемого им белка CREB и его фосфорилированной формы pCREB. Секретрируемая форма CDNF не повлияла на экспрессию *Akt*, уровень белка АКТ и его фосфорилирование. Также нами не было отмечено эффектов на экспрессию гена тирозингидроксилазы (*Th*) и уровень соответствующего белка.

Таким образом, нами впервые показано, что конститутивно секретрируемая форма CDNF может влиять на рост нейрональных отростков у клеток линии N1E-115. Кроме того, секретрируемая форма CDNF вызвала умеренное улучшение моторных навыков у мышей линии Prnp-SNCA*A53T. Однако, молекулярные каскады, осуществляющие трансдукцию сигнала при секреции CDNF, еще предстоит установить.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-15-00011.

Список литературы

1. Pakarinen E., Lindholm P. CDNF and MANF in the brain dopamine system and their potential as treatment for Parkinson's disease // Front Psychiatry. 2023. Vol. 14. ID 1188697. doi: 10.3389/fpsy.2023.1188697
2. Huttunen H.J., Saarma M. CDNF protein therapy in Parkinson's disease // Cell Transplant. 2019. Vol. 28, N 4. P. 349–366. doi: 10.1177/0963689719840290
3. Liu H., Zhao C., Zhong L., et al. Key subdomains in the C-terminal of cerebral dopamine neurotrophic factor regulate the protein secretion // Biochem Biophys Res Commun. 2015. Vol. 465, N 3. P. 427–432. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.08.029
4. Maciel L., de Oliveira D.F., Mesquita F., et al. New cardiomyokine reduces myocardial ischemia/reperfusion injury by PI3K-AKT pathway via a putative KDEL-receptor binding // J Am Heart Assoc. 2021. Vol. 10, N 1. P. 1–35. doi: 10.1161/JAHA.120.019685
5. Parkash V., Lindholm P., Peränen J., et al. The structure of the conserved neurotrophic factors MANF and CDNF explains why they are bifunctional // Protein Eng Des Sel. 2009. Vol. 22, N 4. P. 233–241. doi: 10.1093/protein/gzn080

Карагяур М.Н.¹, Бозов К.Д.¹ ✉, Примак А.Л.¹, Шелег Д.А.¹, Арбатский М.С.¹, Джауари С.С.¹, Илларионова М.Е.¹, Семина Е.В.¹, Самоходская Л.М.¹, Климович П.С.¹, Чечехин В.И.¹, Попов В.С.¹, Рубина К.А.¹, Макусъ Ю.В.¹, Цыганков Б.Д.^{1,2}, Ткачук В.А.¹, Нейфельд Е.А.^{1,2}

Поиск и установление функции морфогенетических факторов головного мозга, сопряженных с развитием когнитивных и психических расстройств

¹ Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, Москва, Россия

✉ kir-bozov@yandex.ru

Аннотация. Одной из причин возникновения психических заболеваний считают нарушение закладки и развития головного мозга. Идентификация генов морфогенеза головного мозга, вовлеченных в формирование предрасположенности к развитию таких заболеваний, позволит предложить новые подходы к их профилактике и терапии.

Ключевые слова: морфогенез головного мозга; параноидная шизофрения; большое депрессивное расстройство; геномный вариант; нейральные сфероиды; нейротрофические факторы; направляющие молекулы.

Karagyaour M.N.¹, Bozov K.D.¹, Primak A.L.¹, Sheleg D.A.¹, Arbatsky M.S.¹, Dzhauari S.S.¹, Illarionova M.E.¹, Semina E.V.¹, Samokhodskaya L.M.¹, Klimovich P.S.¹, Chechekhin V.I.¹, Popov V.S.¹, Rubina K.A.¹, Makus Yu.V.¹, Tsygankov B.D.^{1,2}, Tkachuk V.A.¹, Neyfeld E.A.^{1,2}

Identification and establishment of functional significance of brain morphogenetic factors associated with the development of cognitive and psychiatric disorders

¹ Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Federal State Budgetary Educational Institution of the Higher Education "Russian University of Medicine" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Impaired brain development is considered to be one of the causes of inherit forms of psychiatric diseases. The identification of brain morphogenic genes and their variants implicated in laying the basis of such diseases allows proposing new approaches to their prevention and therapy.

Keywords: brain morphogenesis; paranoid schizophrenia; major depressive disorder; gene variants; neural spheroids; neurotrophic factors; guidance molecules.

По данным Всемирной организации здравоохранения на 2022 год число лиц, страдающих психическими расстройствами, превысило 1 миллиард человек [1]. Одной из возможных причин возникновения наследственных форм таких заболеваний считают нарушение функции генов, вовлеченных в процессы развития головного мозга [2]. Идентификация и подтверждение функциональной значимости вариантов таких генов в формировании предрасположенности к развитию психических заболеваний позволит дополнить существующие диагностические панели и предложить новые подходы к терапии и профилактике ряда таких заболеваний.

Целью данного исследования было изучение роли патогенного варианта гена морфогенеза мозга от мента его выявления в российской популяции до установления молекулярных механизмов его патогенной активности. В центре внимания находились гены нейротрофических факторов и их рецепторов, гены

навигационных молекул и их рецепторов, а также гены молекул межклеточной адгезии и их лиганды — всего 160 генов. Исследование проводили на пациентах с установленным диагнозом параноидная шизофрения и эндогенная депрессия, при этом предпочтение при включении в группы исследования отдавали пациентам с семейными, рано проявляющимися, резистентными к терапии формами данных заболеваний. Исследование было одобрено Межвузовским Комитетом по этике от 16.12.2021 (выписка из протокола № 11). Все пациенты участвовали в исследовании добровольно, информированные согласия были подписаны самими пациентами или их опекунами (в случае недееспособности пациента). После опроса, проведенного психиатром, с целью установления формы заболевания, его фазы и тяжести, у пациента забирали образец венозной крови из которой выделяли мононуклеары периферической крови. Из мононуклеаров выделяли геномную ДНК, которую использовали для полноэкзомного секвенирования и скрининга выявленных геномных вариантов.

Полноэкзомное секвенирование геномной ДНК 11 и 10 пациентов, страдающих, соответственно, параноидной шизофренией или депрессивным расстройством, выявило более 220 однонуклеотидных миссенс-мутаций в 79 морфогенных генах мозга (из 160 исследованных генов). Среди этих генов — гены нейротрофических факторов (BDNF, NGF) и их рецепторов (GFRA1, RET), гены молекул межклеточной адгезии (кадгерины и протокадгерины), а также гены навигационных молекул (семафорины, эфрины, PLAU) и их рецепторов (рецепторы эфринов, нейропилины, плексины и PLAUR) [2]. Практически для всех идентифицированных молекул функциональное значение и молекулярные механизмы участия в развитии психических нарушений не установлено.

Для выяснения вклада некоторых из идентифицированных геномных вариантов нами были использованы *in vitro* и *in vivo* модели. В качестве *in vitro* модели мы использовали модель нейрогенеза *in vitro* — нейроглиальные сфероиды, полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) здорового донора или иПСК с смоделированными геномными вариантами (CDH13 rs736719, DCHS2 rs11935573, ERNA1 rs11768549, NGF rs138175552, PLXNA3 rs139336954, PLAU rs1243306395). Перечисленные геномные варианты были смоделированы с помощью цитозин-деаминазного редактора оснований — модификации системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Для визуализации деполяризации нейронов и дифференциации разных типов клеток (глутаматергические, ГАМКергические и дофаминергические нейроны, астроциты и олигодендроциты) внутри сфероидов нами был создан ряд генетических конструкций, кодирующих флуоресцентные белки или Ca²⁺-чувствительные сенсоры под контролем нейрон- или глия-специфичных промоторов. В полученных нейронных сферах с различными геномными вариантами проводится оценка соотношений между нейронными и глиальными клетками, соотношений между возбуждающими и тормозными нейронами, положения нейронных и глиальных клеток внутри сфероидов, спонтанной и индуцированной электрической активности различных типов нейронов. Дифференцировка иПСК в нейрональные и глиальные клетки внутри нейрональных сфероидов была также подтверждена иммуногистохимическим окрашиванием полученных сфероидов для выявления нейрон- и глия-специфических маркеров.

В *in vivo* модели на мышах был смоделирован геномный вариант rs1243306395 в гене *PLAU*, кодирующий аминокислотную замену в активном центре белка *PLAU*. На данный момент получено несколько гетерозиготных мышей, несущих замену в активном центре *PLAU*. На гомозиготных линиях мышей, будут изучены особенности их поведения (когнитивные, эмоциональные и социальные навыки) и особенности морфологии их мозга.

Таким образом, в российской популяции были выявлены варианты в морфогенных генах мозга (*BDNF*, *CDH2*, *CDH3*, *CDH23*, *DCHS2*, *PLAUR*), ассоциированные с предрасположенностью к параноидной шизофрении или депрессивного расстройства. Установление функциональной значимости, молекулярных механизмов и прогностической ценности идентифицированных геномных вариантов в развитии предрасположенности психических заболеваний требует их изучения с использованием *in vitro* и *in vivo* моделей.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-00125, <https://rscf.ru/project/22-15-00125/>.

Список литературы

1. [www.who.int](https://www.who.int/publications/i/item/9789240049338) [Электронный ресурс]. World mental health report: Transforming mental health for all. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240049338>
2. Primak A., Bozov K., Rubina K., et al. Morphogenetic theory of mental and cognitive disorders: the role of neurotrophic and guidance molecules // *Front Mol Neurosci*. 2024. Vol. 17. ID 1361764. doi: 10.3389/fnmol.2024.1361764
3. Karagayur M., Primak A., Bozov K., et al. Novel missense variants in brain morphogenic genes associated with depression and schizophrenia // *Front Psychiatry*. 2024. Vol. 15. ID 1338168. doi: 10.3389/fpsyt.2024.1338168

Карагяур М.Н.¹, Примак А.Л.¹ ✉, Басалова Н.А.¹, Монакова А.О.¹, Джауари С.С.¹, Толстолужинская А.Е.¹, Григорьева О.А.¹, Ефименко А.Ю.¹, Калинина Н.И.¹, Кулебякина М.А.¹, Чечехина Е.С.¹, Виговский М.А.¹, Усачёв В.А.¹, Чечехин В.И.¹, Яковлева Т.К.², Турилова В.И.², Шагимарданова Е.И.³, Газизова Г.Р.³, Кулебякин К.Ю.¹, Сысоева В.Ю.¹, Бозов К.Д.¹, Попов В.С.¹, Акопьян Ж.А.¹, Ткачук В.А.¹

Иммортиализованные мезенхимные стромальные клетки человека как платформа для разработки лекарственных препаратов для регенеративной медицины

¹ Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУН Институт цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, Россия

✉ primak.msu@mail.ru

Аннотация. Иммуортализация первичных культур мезенхимных стромальных клеток (МСК) человека замедляет их старение, стабилизирует состав и сохраняет активность продуцируемого ими секретомы. Секретомы иммуортализованных МСК может служить основой при разработке лекарственных препаратов для регенеративной медицины.

Ключевые слова: секретомы; иммуортализованные клеточные культуры; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; регенерация; секреторный фенотип; ассоциированный со старением.

Karagyaour M.N.¹, Primak A.L.¹, Basalova N.A.¹, Monakova A.O.¹, Dzhauari S.S.¹, Tolstoluzhinskaya A.E.¹, Grigorieva O.A.¹, Efimenko A.Yu.¹, Kalinina N.I.¹, Kulebyakina M.A.¹, Chechekhina E.S.¹, Vigovskiy M.A.¹, Usachev V.A.¹, Chechekhin V.I.¹, Yakovleva T.K.², Turilova V.I.², Shagimardanova E.I.³, Gazizova G.R.³, Kulebyakin K.Yu.¹, Sysoeva V.Yu.¹, Bozov K.D.¹, Popov V.S.¹, Akopyan Zh.A.¹, Tkachuk V.A.¹

Immortalized human mesenchymal stromal cells as a platform for drug development for regenerative medicine

⁴ Medical Research and Education Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St Petersburg, Russia

⁶ Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Immortalization of primary human mesenchymal stromal cells (MSCs) postpones their ageing, stabilizes the composition and activity of their secretome. The secretome of immortalized MSCs may serve as a basis for the development of drugs for regenerative medicine.

Keywords: cell secretome; immortalized cell cultures; mesenchymal stromal cells; regeneration; senescence-associated secretory phenotype.

Секретом мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) содержит широкий спектр факторов роста и регенераторных молекул и считается перспективным инструментом для разработки биофармацевтических композиций, предназначенных для защиты тканей от повреждения и стимуляции регенерации. Первичные культуры МСК как продуценты секретомы имеют ряд ограничений: необходимость большого количества доноров, вариабельность свойств МСК и их секретомы в зависимости от тканевого источника и донора, быстрое старение культуры МСК, необходимость биологической и микробиологической характеристики каждой новой культуры МСК. Иммуортализация МСК (например, посредством сверхэкспрессии гена каталитической субъединицы теломеразы TERT) рассматривается как один из возможных подходов

к продлению времени жизни и продуктивности культур МСК. Однако эффективность и безопасность образцов секретомы, полученных от immortalized клеток, не были тщательно изучены, что и является предметом данного исследования.

Нами были изучены состав и функциональные свойства секретомы immortalized культуры МСК (иМСК), полученной и охарактеризованной ранее [1]. Протеомный и иммуоферментный анализ секретомы иМСК показал, что генетическая модификация МСК с помощью TERT не приводит к существенному изменению качественного и количественного состава их секретомы и не изменяет содержания в нем мозгового нейротрофического фактора (BDNF), урокиназного активатора плазминогена (uPA), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), гепатоцитарного фактора роста (HGF). Полученные результаты коррелировали с данными анализа уровня экспрессии ключевых факторов роста и цитокинов методом ПЦР в реальном времени лизатов иМСК, который показал, что immortalization МСК значимым образом не изменяет экспрессию BDNF, VEGF, HGF и uPA, фактора некроза опухоли (TNF α), трансформирующего фактора роста (TGFB1), индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) и интерлейкинов: IL-1 α , IL-6, IL-4, IL-10, IL-13. В модели пост-травматической интрацеребральной гематомы у крыс [2] секретомой иМСК так же эффективно, как и секретомой первично выделенных МСК, стимулирует нейропротекцию мозговой ткани, снижает тяжесть неврологических нарушений и уменьшает объем повреждения мозговой ткани.

Immortalization культуры МСК позволяет стабилизировать состав ее секретомы в ходе длительного культивирования (до 30 пассажей и более), при этом сохраняется биологическая активность секретомы, что было подтверждено в ряде валидированных ранее *in vitro* моделей, в которых оценивается способность секретомы стимулировать продукцию тестостерона клетками Лейдига [3] и подавлять дифференцировку фибробластов в миофибробласты [4]. Immortalization МСК отсрочивает появление в составе секретомы компонентов секреторного фенотипа, ассоциированного со старением клеточной культуры (т.н. senescence-associated secretory phenotype, SASP).

Важно отметить, что секретомой immortalized культур МСК не содержит детектируемых количеств теломеразы (ни в виде белка, ни в виде кодирующих ее ДНК или РНК) и не обладает трансформирующей активностью в *in vitro* модели диссоциированной культуры первичных фибробластов в агаре.

Полученные данные позволяют рассматривать секретомой иМСК как перспективную основу для биологических лекарственных препаратов, направленных на стимуляцию регенерации тканей, а культуры иМСК — как перспективный источник для получения стандартизированного биологически активного секретомы в количествах, достаточных для широкомасштабного клинического использования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>.

Список литературы

1. Primak A., Kalinina N., Skryabina M., et al. Novel immortalized human multipotent mesenchymal stromal cell line for studying hormonal signaling // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 4. ID 2421. doi: 10.3390/ijms25042421
2. Karagyaur M., Dzhaouri S., Basalova N., et al. MSC Secretome as a promising tool for neuroprotection and neuroregeneration in a model of intracerebral hemorrhage // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, N 12. ID 2031. doi: 10.3390/pharmaceutics13122031
3. Monakova A., Sagaradze G., Basalova N., et al. Novel potency assay for MSC Secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 16. ID 9414. doi: 10.3390/ijms23169414
4. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., et al. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated micrnas within extracellular vesicles // *Cells*. 2020. Vol. 9, N 5. ID 1272. doi: 10.3390/cells9051272

Каралкин П.А.^{1,2} ✉, Кудрин К.Г.¹, Святославов Д.С.¹, Усатов Д.А.¹, Решетов И.В.¹

Биомиметические подходы к усилению регенеративного потенциала персонализированных костных титановых имплантатов

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

✉ pkaralkin@gmail.com

Аннотация. Усиление регенеративных свойств пористых титановых имплантатов с помощью нанесения биоактивных покрытий оценивали в тестах *in vitro* на культурах клеток человека, а также *in vivo* на кроликах и обезьянах. Полученные результаты показали значительное улучшение биосовместимости и остеоиндукции изделий.

Ключевые слова: персонализированные пористые титановые имплантаты; биоактивные покрытия; аддитивные технологии.

Karalkin P.A.^{1,2}, Kudrin K.G.¹, Svyatoslavov D.S.¹, Usatov D.A.¹, Reshetov I.V.¹

Biomimetic approaches to enhance the regenerative potential of personalised bone substitute titanium implants

³ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁴ P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, Moscow, Russia

Abstract. Enhancement of the regenerative properties of porous titanium implants by applying bioactive coatings was assessed *in vitro* tests on human cell cultures, as well as *in vivo* tests on rabbits and monkeys. The results obtained showed a significant improvement in biocompatibility and osteoinduction properties.

Keywords: personalized porous titanium implants; bioactive coatings; additive technologies.

Неизменное повышение частоты онкологических заболеваний и травм костей скелета приводит к увеличению потребности в специализированной помощи при устранении протяженных костных дефектов [1]. Несмотря на определенные достижения в разработке и применении полимерных и керамических остеопластических материалов, использование имплантатов на основе металлов, в первую очередь титана и его сплавов, на сегодняшний день остается безальтернативным вариантом для замещения дефектов костной ткани в таких нагружаемых областях, как кости лицевой части черепа, нижняя челюсть, позвоночник и крупные суставы [2]. При этом применение аддитивных технологий позволяет получать изделия с необходимыми прочностными характеристиками с учётом анатомических особенностей, способные содержать как пористые, так и сплошные конструктивные элементы для наиболее эффективной реконструкции протяженных дефектов [3].

С точки зрения усиления регенеративных свойств титановых имплантатов перспективным подходом является нанесение на их поверхности биоактивных покрытий, содержащих набор биогенных компонентов, обеспечивающих улучшенную механическую прочность, коррозионную стойкость, биоактивность и бактерицидность [4,5]. Описанный выше подход был реализован нами при разработке многоэтапной технологии создания персонализированных пористых имплантатов из титанового сплава ВТ-6 (TiAl6V4) с биоактивными покрытиями на основе TiCN, модифицированные Ca, P и O (TiCaPCON), нанесенными методом магнетронного напыления. Весь комплекс биологических исследований *in vitro* был выполнен на 3D-образцах без покрытий, а также образцах с многокомпонентными биоактивными покрытиями, в отдельных случаях, содержащих

в своем составе также ионы серебра (Ag). В экспериментах были использованы два вида клеток: культура остеосаркомы человека линии MG-63 (тест-культура) и первичная культура мультипотентных стромальных клеток костного мозга (МСК КМ) здоровых доноров.

Методом непрямого контакта показано отсутствие у всех образцов острой токсичности в отношении тест-культуры. С помощью МТТ-теста и окрашивания Live/Dead было показано, что разработанные покрытия на пористом имплантате из титана не снижают жизнеспособности и не подавляют пролиферативных потенциалов клеток линии MG-63. Скорость экспансии клетками поверхности титановых образцов не отличалась от контроля (полистирен). Динамику адгезии клеток MG-63 к поверхности опытных образцов без покрытия и с двумя типами биоактивных покрытий изучали при помощи конфокальной микроскопии и иммуноцитохимии с использованием антител к винкулину и окрашивания фаллоидином. Были выявлены выраженные адгезивные свойства покрытия на модифицированном титане: площадь клеток и количество фокальных контактов в этой группе через 24 часа культивирования были значительно больше по сравнению с образцами чистого титана.

Оценку способности образцов поддерживать индуцированную остеогенную дифференцировку МСК КМ проводили посредством их культивирования в среде «MesenCult Osteogenic Medium» на поверхности различных титановых образцов. В изучаемых культурах методом ПРЦ-РВ анализировали экспрессию маркерных генов остеогенной дифференцировки — RunX2 и Alpl. Достоверное повышение экспрессии указанных генов позволило предположить у изделий с биопокрытиями наличие повышенной способности к остеоинтеграции в случае имплантации их в область костного дефекта *in vivo*.

Исследования биомеханических и остеоиндуктивных свойств имплантатов в моделях костных дефектов проведены на кроликах породы Советская шиншилла. Были сформированы модельные костные дефекты и выполнено имплантирование изготовленных изделий в нижнюю челюсть животных. Отмечались хорошая переносимость оперативных вмешательств по установке имплантатов, а также начальные признаки репаративного остеогенеза. В результате рентгенографических исследований зоны имплантации уже через 3 месяца выявлены признаки остеоиндукции.

Также были проведены исследования биомеханических и остеоиндуктивных свойств имплантатов в моделях костных дефектов у крупных лабораторных животных. Исследования проведены на обезьянах вида павиан анубис путём имплантации индивидуальных изделий, замещающих дефекты угла нижней челюсти и скулоорбитального фрагмента лицевого скелета. Костную регенерацию оценивали рентгенологически по набору количественных параметров — размер костной мозоли, наличие очагов резорбции и литических изменений, затемнение пористых структур в проксимальном отделе, показавших хорошую консолидацию и восстановления функции в области имплантации.

Таким образом, наличие биоактивных свойств, высокой износостойкости и возможности осаждения на поверхность с развитым рельефом делает покрытия состава TiCaPCON перспективным материалом для модификации высокопористых остеоиндуктивных имплантатов, обладающих мультимодальным распределением пор и изготовленных методом селективного лазерного плавления. При этом дополнительные бактерицидные свойства имплантатов возможно получить благодаря имплантации ионов серебра (Ag) в структуру поверхностного напыления.

Список литературы

1. Juncar M., Tent P.A., Juncar R.I., et al. An epidemiological analysis of maxillofacial fractures: a 10-year cross-sectional cohort retrospective study of 1007 patients // BMC Oral Health. 2021. Vol. 21, N 1. ID 128. doi: 10.1186/s12903-021-01503-5
2. Davis R., Singh A., Jackson M.J., et al. A comprehensive review on metallic implant biomaterials and their subtractive manufacturing // Int J Adv Manuf Technol. 2022. Vol. 120. P. 1473–1530. doi: 10.1007/s00170-022-08770-8
3. Park J., Zobaer T., Sutradhar A.A. Two-scale multi-resolution topologically optimized multi-material design of 3d printed craniofacial bone implants // Micromachines. 2021. Vol. 12, N 2. ID 101. doi: 10.3390/mi12020101
4. Narayanan R., Seshadri S.K., Kwon T.Y., Kim K.H. Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys // J Biomed Mater Res B Appl Biomater. 2008. Vol. 85B, N 1. P. 279–299. doi: 10.1002/jbm.b.30932
5. Xue T., Attarilar S., Liu S., et al. Surface modification techniques of titanium and its alloys to functionally optimize their biomedical properties // Front Bioeng Biotechnol. 2020. Vol. 8. ID 603072. doi: 10.3389/fbioe.2020.603072

Кардош А.В.¹✉, Бикмулина П.Ю.¹, Ревокатова Д.П.¹, Ефремов Ю.М.¹, Кошелева Н.В.¹, Шпичка А.И.¹, Тимашев П.С.^{1,2}

Подходы к формированию и характеристике органоидов на основе различных типов клеток

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Центр «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения», ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

✉ ankardosh@gmail.com

Аннотация. В данной работе были получены двумя способами и подробно охарактеризованы две группы сферических органоидов на основе кератиноцитов и фибробластов. Особое внимание было уделено изучению процессов самоорганизации клеток в составе органоидов, включая пространственные перемещения и дифференцировку.

Ключевые слова: органоиды; трехмерные клеточные культуры; модели кожи.

Kardosh A.V.¹, Bikmulina P.Yu.¹, Revokatova D.P.¹, Efremov Yu.M.¹, Kosheleva N.V.¹, Shpichka A.I.¹, Timashev P.S.^{1,2}

Approaches to formation and characterization of organoids based on different cell types

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. In this study, two groups of spherical organoids were obtained from keratinocytes and fibroblasts using two methods and characterized in detail. Particular attention was paid to the processes of cell self-organization within organoids, including spatial movement and differentiation.

Keywords: organoids; three-dimensional cell cultures; skin models.

Органоиды — это самоорганизующиеся клеточные структуры, которые получают путем культивирования в трехмерных условиях стволовых или соматических клеток с их последующей кластеризацией, часто сопровождающейся дифференцировкой в функциональные клеточные типы. Органоиды частично воспроизводят структуру и функции нативного органа, поэтому иногда их называют «мини-органами» [1, 2]. Они находят применение как модели для изучения процессов, происходящих в эмбриогенезе, для моделирования заболеваний, как *in vitro* системы для разработки и тестирования лекарств. Кроме того, органоиды имеют потенциал в регенеративной медицине в качестве клеточных трансплантатов для замещения дефектов тканей и органов [1]. Однако в настоящее время недостаточно изучено, как начальные условия формирования влияют на процессы самоорганизации клеток, включая пространственные перемещения, сортировку и дифференцировку, в составе органоидов, что ограничивает их использование в качестве биологических моделей.

В данной работе были сформированы двумя разными способами и детально изучены органоиды, воспроизводящие структуру кожи, из кератиноцитов и фибробластов человека линий HaCaT и 977hTERT соответственно. Группу органоидов, названную «1:1», формировали посредством смешения в равном соотношении двух типов клеток; группу «ядро–оболочка» получали путем наслоения кератиноцитов на ядро из фибробластов. Помимо этого, были сформированы две контрольные группы сфероидов, полученных только из одного типа клеток — либо из кератиноцитов, либо из фибробластов. Впоследствии исследовали

различные биологические свойства органоидов, включая морфологию, динамику изменения диаметров, способность к реактивации, биомеханические свойства, а также локализацию и количественное содержание эпителиальных и мезенхимных маркеров методами иммуноцитохимического окрашивания, количественной ПЦР с обратной транскрипцией и вестерн-блота. Кроме того, была проведена оценка дифференцировочного статуса кератиноцитов в органоидах путем анализа экспрессии соответствующих генов.

Было продемонстрировано, что получение компактизованных сферических органоидов из выбранных линий клеток возможно при разных начальных условиях формирования. Изучение динамики изменения диаметров показало, что органоиды обеих групп уменьшаются на 30–60 мкм в связи с компактизацией и отслоением клеток с поверхности. Исследование поверхности полученных органоидов методом сканирующей электронной микроскопии позволило выявить морфологические различия между двумя группами. Эксперименты по реактивации показали, что органоиды образуют монослой активнее и полнее, чем контрольные сфероиды, полностью реактивируясь за 4 дня культивирования в адгезивных условиях. В ходе изучения биомеханических свойств клеточных структур было выявлено, что органоиды группы «1:1» в 3,5 раза жестче, чем органоиды группы «ядро-оболочка». Исследование локализации маркерных белков показало, что органоиды «ядро-оболочка» сохраняют и поддерживают свою двуслойную архитектуру в ходе культивирования, а в группе «1:1» происходит миграция фибробластов внутрь структуры с образованием «дермального» ядра и «эпидермальной» оболочки из кератиноцитов *de novo*. Было также продемонстрировано, что различия в условиях формирования органоидов не влияют на экспрессию генов *VIM* и *KRT19*, а также на количественное содержание виментина и кератина 19. На финальном этапе работы было установлено, что в обеих группах органоидов поддерживается низкий уровень экспрессии генов терминальной дифференцировки *IVL*, *LOR*, *FLG*. Это позволило заключить, что в органоидах преобладают малодифференцированные кератиноциты. Кроме того, было показано, что кератиноциты в органоидах «1:1» являются менее дифференцированными по сравнению с данными клетками в органоидах «ядро-оболочка», поскольку в группе «1:1» превалирует экспрессия пары генов базальных кератиноцитов *KRT14/KRT5*, а в группе «ядро-оболочка» — экспрессия пары генов *KRT10/KRT1*, свойственная дифференцирующимся кератиноцитам.

По результатам работы было сделано несколько заключений, относящихся к применению полученных органоидов из кератиноцитов и фибробластов в качестве биологических моделей. Во-первых, в органоидах клетки поддерживают более физиологичное состояние, чем в сфероидах, поэтому для получения релевантной модели ткани на основе трехмерных клеточных культур следует использовать как минимум два типа клеток. Во-вторых, органоиды, образованные путем наложения кератиноцитов на ядро из фибробластов, имеют более явную дермально-эпидермальную архитектуру и более дифференцированные кератиноциты в своем составе, в связи с чем могут применяться как простейшие модели кожи *in vitro*. Наконец, органоиды, сформированные путем смешения кератиноцитов и фибробластов, более применимы для фундаментального изучения организации и взаимодействия клеток в структуре ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках гранта соглашение № 075-15-2024-640 (Сеченовский Университет).

Список литературы

1. Corró C., Novellademunt L., Li V.S.W. A brief history of organoids // *Am J Physiol-Cell Physiol*. 2020. Vol. 319, N 1. P. 151–165. doi: 10.1152/ajpcell.00120.2020
2. Li M., Izpisua Belmonte J.C. Organoids — preclinical models of human disease // *N Eng J Med*. 2019. Vol. 380, N 6. P. 569–579. doi: 10.1056/NEJMr1806175

Карпенко Д.В.¹ ✉, Капранов Н.М.¹, Бигильдеев А.Е.^{1,2}

Сильные иммунные привилегии позволяют Nes-GFP⁺ стволовым клеткам выживать при трансплантации в реципиента, иммунизированного GFP

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

✉ bigildeev.ae@yandex.ru

Аннотация. Nes-GFP⁺ стволовые клетки выживают в иммунизированном против GFP реципиенте и сохраняют функциональность. Данные получены на проточной цитофлуориметрии и функционально по способности формировать и поддерживать первичные и вторичные очаги кроветворения при изогенной трансплантации костного мозга.

Ключевые слова: стволовые клетки; раковые стволовые клетки; иммунные привилегии; МСК.

Karpenko D.V.¹, Kapranov N.M.¹, Bigildeev A.E.^{1,2}

Strong immune privilege allows Nes-GFP⁺ stem cells to survive when transplanted into a GFP-immunized recipient

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Nes-GFP⁺ stem cells survive and remain functional in the GFP-immunized recipient. Data were obtained using flow cytometry and functionally basing on the ability to form and maintain primary and secondary foci of hematopoiesis during isogenic bone marrow transplantation.

Keywords: stem cells; cancer stem cells; immune privileges; MSC.

Иммунные привилегии (ИП) — это способность уходить от цитотоксического воздействия со стороны иммунитета. ИП обнаруживаются при выживании клеток, иммунологически отличающихся от клеток организма, это отмечается как для аллогенных и ксеногенных клеток в организме реципиента после соответствующей алло- или ксенотрансплантации, так и для собственных клеток организма при возникновении опухолевого заболевания, ассоциированного с появлением неоантигенов в раковых клетках. Исторически ИП демонстрировались на территории глаза, мозга, семенников, плаценты и хрящей и ассоциировались с наличием барьеров, препятствующих проникновению иммунных клеток. Недавние исследования демонстрируют ИП для стволовых клеток волосяного фолликула, мышц и костного мозга в небарьерных тканях.

Используя модель очагов эктопического кроветворения под капсулой почки, в которой донорами костного мозга были трансгенные мыши F1(C57Bl/6 x Nestin-GFP), в стволовых клетках и клетках-прогениторах которых под промотором нестина экспрессируется GFP, а реципиентами являлись мыши той же базовой линии C57Bl/6, мы демонстрировали ИП для мезенхимных стволовых клеток (МСК). В новом эксперименте мы предварительно проиммунизировали реципиентов против GFP. Несмотря на иммунизацию, очаги формировались ($n = 7$). Нам также удалось получить вторичные очаги ($n = 3$) после ретрансплантации первичных. Изученные первичные и вторичные очаги содержали Nes-GFP⁺ клетки.

Полученные результаты особенно интересны при сравнении с областями классических ИП, где повреждение или направленная иммунизация нарушают ИП: например, травма одного глаза может приводить

к воспалению и иммунологически обусловленному повреждению здорового глаза. Вместе с тем, мы видим функциональные сходства нормальных стволовых клеток с опухолевыми стволовыми клетками, которые способны переживать действие иммунной системы, уничтожающей их потомков, а при нарушении иммунитета демонстрируют сохранение функционала и вызывают рецидив опухоли.

Стволовые клетки, их ближайшие потомки и связанные с ними регуляции можно обобщить в стволовую систему, демонстрирующую тесную взаимную связь с иммунной системой. Взаиморегуляция стволовой и иммунной систем выражается в комплексе пересекающихся и взаимозаменяемых молекулярных механизмов, в том числе, отвечающих за ИП. Это наблюдение даёт основание ожидать, что для ряда опухолевых стволовых клеток ИП — это не частные уникальные приобретённые механизмы, но комплекс, связанный со стволовым состоянием клетки.

Вероятным объяснением существования столь опасных для выживания механизмов ИП в стволовых нишах является их вовлечение в периферический контроль аутоиммунитета. Это подкрепляется тем, что стволовые клетки не просто избегают действия иммунных клеток, но активно их привлекают выделяемыми хемокинами и репрограммируют. Более того, отмечается необходимость иммунных клеток в микроокружении стволовых клеток не только при патологии, но и в норме.

Демонстрируемые результаты представляют новый ракурс на применение стволовых клеток в регенеративной медицине и трансплантологии, а также дополняют представление в вопросах онкологии и аутоиммунных патологий.

Карпенко Д.В.¹ ✉, Бигильдеев А.Е.^{1,2}

Воспаление стимулирует регенеративный потенциал стволовой системы и вызывает формирование воспалительной памяти в кроветворной территории

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

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

✉ d_list.ru

Аннотация. Очаги эктопического кроветворения формируются увеличенного размера как в иммунизированных мышцах, так и при ретрансплантации в неиммунизированных. Воспалительный стимул активирует регенеративную программу стволовой системы и формирует функциональную воспалительную память в очаге кроветворения.

Ключевые слова: МСК; очаг эктопического кроветворения; воспаление; регенерация.

Karpenko D.V.¹, Bigildeev A.E.^{1,2}

Inflammation stimulates the regenerative potential of the stem system and causes the formation of inflammatory memory in the hematopoietic territory

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Foci of ectopic hematopoiesis are formed of increased size both in immunized mice and during retransplantation in non-immunized mice. The inflammatory stimulus activates the regenerative program of the stem system and forms a functional inflammatory memory in the focus of hematopoiesis.

Keywords: MSC; hematopoietic ectopic foci; inflammation; regeneration.

Стволовые клетки, их потомки и другие клетки участвующие в формировании стволовой ниши, а также и не клеточные компоненты демонстрируют не только локальное, но и системное участие в регуляции регенерации и воспаления. Это является основанием предложить использование термина «стволовая система» для описания сложного комплекса клеток и взаимодействий. Широко отмечается что воспалительные сигналы так же служат активаторами для стволовых клеток и участвуют в организации регенерации. Учитывая это, мы провели ретроспективный анализ данных по очагам эктопического кроветворения формирующихся под капсулой почки после трансплантации туда костного мозга. На объединённых данных мы показали, что иммунизация индуцирует формирование очагов увеличенного размера в 2,3 раза ($n = 13$ и $n = 14$, $p = 0.0078$). Более того при ретрансплантации очаги так же формируются увеличенного размера в 4,6 раза ($n = 6$ и $n = 3$, $p = 0.048$). Это говорит не только о том, что воспалительный стимул активирует регенеративную программу стволовой системы, но и формирует эпигенетический отпечаток в виде функциональной воспалительной памяти у ретрансплантируемого очага кроветворения. Представленные результаты основаны на агрегированных данных из различных экспериментов, что может иметь влияние на результат, это актуализирует проведение отдельного исследования. Уже полученные исследовательские научные результаты имеют высокий потенциал к изучению и последующей трансляции в медицину.

Карсунцева Е.К.¹✉, Воронова А.Д.¹, Степанова О.В.^{1,2}, Фурса Г.А.^{1–3}, Шишкина В.С.¹, Чадин А.В.¹, Чехонин В.П.^{1,3}

Эффективность билатеральной трансплантации трансдуцированных обкладочных клеток, экспрессирующих нейротрофический фактор BDNF, в гиппокамп крыс в терапии экспериментальной болезни Альцгеймера

¹ ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГБУ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия

✉ katya.karsunceva@gmail.com

Аннотация. Впервые в гиппокамп крыс со смоделированной БА была проведена трансплантация трансдуцированных обкладочных клеток обонятельной выстилки, экспрессирующих нейротрофические факторы. Показано, что трансплантация этих генно-клеточных конструкторов способствует улучшению показателей когнитивных функций.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; моделирование болезни Альцгеймера; клеточная терапия; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; бета-амилоид; аденовирусная трансдукция; нейротрофические факторы; BDNF; поведенческие тесты.

Karsuntseva E.K.¹, Voronova A.D.¹, Stepanova O.V.^{1,2}, Fursa G.A.^{1–3}, Shishkina V.S.¹, Chadin A.V.¹, Chekhonin V.P.^{1,3}

Efficiency of bilateral transplantation of transduced ensheathing cells expressing the neurotrophic factor BDNF, in rat hippocampus in the treatment of experimental Alzheimer's disease

¹ V.P. Serbsky National Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow, Russia

² National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russia

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. For the first time, transduced olfactory ensheathing cells, olfactory mucosa, expressing neurotrophic factor BDNF, were transplanted into the hippocampus of rats with AD-like disease. It has been shown that transplantation of these gene-cell constructs improves cognitive function.

Keywords: Alzheimer's disease; modeling of Alzheimer's disease; cell therapy; olfactory ensheathing cells; olfactory mucosa; beta-amyloid; adenoviral transduction; neurotrophic factors; BDNF; behavioral tests.

Болезнь Альцгеймера (БА) — это тяжелейшее нейродегенеративное заболевание, которое сопровождается потерей памяти и нарушением когнитивных функций [1]. При БА в коре и гиппокампе выявляются амилоидные бляшки и нейрофибриллярные клубочки, а также наблюдается гибель функциональных нейронов головного мозга, нарушение синаптических связей и нейровоспаление [1]. Применяемые лекарственные препараты для лечения БА оказывают временные эффекты, но не останавливают нейродегенеративные процессы в головном мозге. В связи с этим, активно развивающимися для лечения БА являются такие направления регенеративной медицины, как клеточная и генно-клеточная терапия [1]. Трансплантация клеток в ЦНС способна запускать регенеративные процессы в поврежденной ткани [1], а применение генно-инженерных конструкций направлено на улучшение этих эффектов. Крайне перспективными для трансплантации при БА являются обкладочные клетки обонятельной выстилки [2]. Эти клетки являются особым типом глии, так как обладают одновременно функциями шванновских клеток и астроцитов: они участвуют

в ремиелинизации аксонов, секретируют нейротрофические факторы и обладают способностью к фагоцитозу [2]. Однако трансплантация клеточных и генно-клеточных продуктов на основе этих клеток в головной мозг при БА ранее не проводилась. Целью данной работы было изучить эффективность билатеральной трансплантации трансдуцированных обкладочных клеток, экспрессирующих нейротрофический фактор BDNF, в гиппокамп крыс в терапии экспериментальной болезни Альцгеймера.

Для получения обкладочных клеток из обонятельной выстилки крыс использовали ранее описанный нами протокол [3]. Для трансдукции полученных обкладочных клеток использовали ранее разработанный нами аденовектор Ad5/35-CAG-mBDNF [4]. Моделирование БА проводили на половозрелых самках Вистар путем стереотаксического билатерального введения пептида 1–42 бета-амилоида в гиппокамп. Для валидации модели проводилась оценка когнитивных функций в поведенческих тестах: открытое поле, Y-лабиринт, тест на пассивное избегание и водный лабиринт Морриса. Через 2 месяца после введения 1–42 бета-амилоида проводили билатеральное введение в зону гиппокампа 750 тыс обкладочных клеток ($n = 10$), и 750 тыс обкладочных клеток, трансдуцированных BDNF ($n = 10$). Контрольной группе вводили DMEM/F12 ($n = 10$). Для оценки эффективности трансплантации также применялся тест открытого поля, U-лабиринт, тест на пассивное избегание и водный лабиринт Морриса. Для статистической обработки данных использовали GraphPad Prism 9.0.

В данной работе было показано, что при трансплантации обкладочных клеток и генно-клеточного конструкта несущего зрелую форму нейротрофического фактора mBDNF на основе этих клеток происходит значимое улучшение когнитивных функций в поведенческих тестах по сравнению с контрольной группой. При этом различия в группе введения трансдуцированных клеток были более значимыми. Y-лабиринт позволяет выявить нарушения кратковременной рабочей памяти и способности к спонтанному чередованию, тест на пассивное избегание оценивает способность крыс к обучаемости, а водный лабиринт Морриса применяется для изучения пространственной памяти применяли [5]. Полученные данные могут отражать регенеративные процессы в головном мозге, которые запускает трансплантация обкладочных и трансдуцированных клеток в головном мозге.

Таким образом, впервые в данной работе было показана эффективность трансплантации генно-клеточных конструктов на основе обкладочных клеток в экспериментальной терапии БА. Дальнейшее изучение клеточной терапии БА открывает перспективы использования этого метода для лечения пациентов.

Работа была поддержана грантом РФФИ № 22-1500141.

Список литературы

1. Liu X.-Y., Yang L.-P., Zhao L. Stem cell therapy for Alzheimer's disease // *World J Stem Cells*. 2020. Vol. 12, N 8. P. 787–802. doi: 10.4252/wjsc.v12.i8.787
2. Delarue Q., Guérout N. Transplantation of olfactory ensheathing cells: properties and therapeutic effects after transplantation into the Lesioned nervous system // *Neuroglia*. 2022. Vol. 3, N 1. P. 1–22. doi: 10.3390/neuroglia3010001
3. Патент на изобретение RU 2676142 C2/ 26.12.2018. Чехонин В.П., Степанова О.В., Решетов И.В., и др. Способ получения препарата обкладочных клеток обонятельной выстилки млекопитающих для лечения травм спинного мозга.
4. Voronova A.D., Sosnovtseva A.O., Stepanova O.V., et al. Obtaining a new gene-cell construct based on transduced olfactory ensheathing cells for the treatment of spinal cord injuries // *Bull Exp Biol Med*. 2022. Vol. 173, N 4. P. 529–533. doi: 10.1007/s10517-022-05576-2
5. Pentkowski N.S., Rogge-Obando K.K., Donaldson T.N., et al. Anxiety and Alzheimer's disease: Behavioral analysis and neural basis in rodent models of Alzheimer's-related neuropathology // *Neurosci Biobehav Rev*. 2021. Vol. 127. P. 647–658. doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.05.005

Катаев В.С. ✉, Федотов М.А.

Применение коллоидных наночастиц селена, получаемых методом лазерной абляции, для профилактики и лечения диабета II типа

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова
Российской академии наук, Москва, Россия

✉ kat.vld22@gmail.com

Аннотация. Получены наночастицы селена с применением лазерной абляции в водной среде. Коллоидные частицы обладают уникальными антиоксидантными, противовоспалительными и метаболическими свойствами, позволяющие использовать их в качестве основы для разработки лекарственных препаратов для лечения сахарного диабета.

Ключевые слова: наночастицы селена; лазерная абляция; сахарный диабет; коллоидные растворы.

Kataev V.S., Fedotov M.A.

Application of colloidal selenium nanoparticles obtained by laser ablation for the prevention and treatment of type II diabetes

A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Selenium nanoparticles were obtained using laser ablation in an aqueous medium. Colloidal particles have unique antioxidant, anti-inflammatory and metabolic properties, allowing them to be used as a basis for developing drugs for the treatment of diabetes mellitus.

Keywords: selenium nanoparticles; laser ablation; diabetes mellitus; colloidal solutions.

Сахарный диабет является одной из самых распространенных хронических болезней, затрагивающих миллионы людей по всему миру. Основными типами диабета являются диабет 1 типа, связанный с аутоиммунным разрушением бета-клеток поджелудочной железы, и диабет 2 типа, который характеризуется инсулинорезистентностью и нарушением секреции инсулина. В последние годы нанотехнологии предлагают новые подходы к лечению различных заболеваний, включая диабет. Среди них особое внимание привлекают наночастицы селена, которые имеют уникальные терапевтические свойства.

Популярным способом получения наночастиц является лазерная абляция гранул селена в водной среде. Для реализации метода лазерной абляции используют экспериментальную установку, основными элементами которой являются твердотельный импульсный лазер Nd:YAG с длиной волны излучения 1064 нм в качестве источника излучения и оптическая система, состоящая из фокусирующих линз и преломляющей призмы, позволяя фокусировать и направлять лазерный пучок. В результате облучения образуются частицы размером от 10 до 100 нм. Концентрация селена в коллоидном растворе составляет от 20 до 30 мг/л.

Известно, что селен является компонентом глутатионпероксидаз — ферментов, участвующих в нейтрализации свободных радикалов. Наночастицы могут усиливать антиоксидантную защиту организма, снижая уровень оксидативного стресса, защищая бета-клетки поджелудочной железы от повреждений и поддерживая нормальное функционирование клеток, чувствительных к инсулину [1].

Наноразмерный селен обладает противовоспалительными свойствами, подавляя продукцию провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 (IL-6) и фактор некроза опухоли альфа (TNF- α). Это способствует снижению воспалительных процессов, что может улучшить инсулиновую чувствительность и снизить риск осложнений диабета [2].

Также наночастицы селена участвуют в метаболизме глюкозы и липидов, что особенно важно при диабете 2 типа. Они могут улучшать чувствительность тканей к инсулину и способствовать снижению уровня глюкозы в крови. Это достигается за счет повышения активности инсулиновых рецепторов и улучшения функционирования митохондрий, играющих важную роль в энергетическом обмене клетки [3].

Были проведены исследования влияния введения наноразмерного селена крысам на биохимические показатели. Установлено, что введение наноселена в дозах от 20 до 200 мкг/сут снижает уровень глюкозы и гликозилированного гемоглобина HbA1c до 20% по сравнению с контрольной группой. Также установлено снижение уровня малондиальдегида MDA и интерлейкина-6 IL-6 на 20–30% [4, 5].

Таким образом, наночастицы селена представляют собой перспективное направление в лечении сахарного диабета благодаря своим уникальным терапевтическим свойствам. Их использование позволит замедлить течение заболевания, повысить эффективность лечения и снизить риск осложнений.

Список литературы

1. Peng D., Zhang J., Liu Q., Taylor E.W. Size effect of elemental selenium nanoparticles (Nano-Se) at supranutritional levels on selenium accumulation and glutathione S-transferase activity // *J Inorg Biochem.* 2007. Vol. 101, N 10. P. 1457–1463. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2007.06.021
2. El-Sayed H., Morad M.Y., Sondol H., et al. Myco-synthesized selenium nanoparticles as wound healing and antibacterial agent: An *in vitro* and *in vivo* investigation // *Microorganisms.* 2023. Vol. 11, N 9. ID 2341. doi: 10.3390/microorganisms11092341
3. Liu Y., Zeng S., Liu Y., et al. Synthesis and antidiabetic activity of selenium nanoparticles in the presence of polysaccharides from *Catathelasma ventricosum* // *Int J Biol Macromol.* 2018. Vol. 114. P. 632–639. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.161
4. Гетте И.Ф., Федотов М.А., Султанова Т.Р., и др. Экспериментальное исследование антиоксидантного и антидиабетического действия коллоидного раствора наноразмерного селена // *Вестник Уральской медицинской академической науки.* 2022. Т. 19, № 3. С. 193–202. EDN: DHYNLN doi: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-193-202
5. Савченко Г.Д., Беда Е.С., Малеева М.А., и др. Применение коллоидного раствора наночастиц селена при сахарном диабете в эксперименте. В кн.: *Сборник статей V Международной (75 Всероссийской) научно-практической конференции: «Актуальные вопросы современной медицинской науки и здравоохранения».* № 2. 2020. С. 289–292.

Кветной И.М.^{1,2} ✉, Пальцев М.А.^{3,4}

Мелатонин и мезенхимальные стволовые клетки: молекулярная репарация митохондриальных белков

¹ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

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

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁴ Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

✉ igor.kvetnoy@yandex.ru

Аннотация. Изучена экспрессия митохондриальных белков Tom20, Tom70, Prohibitin, Parkin, VDAC в миокарде крыс под действием мелатонина (MT). MT стабилизирует функцию митохондрий, что позволяет рассматривать его как потенциально эффективный препарат при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; митохондрии; мелатонин; иммуногистохимия; экспрессия митохондриальных белков.

Kvetnoy I.M.^{1,2}, Paltsev M.A.^{3,4}

Melatonin and mesenchymal stem cells: molecular repair of mitochondrial proteins

¹ Saint Petersburg Institute of Phthisiopulmonology, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. The expression of mitochondrial proteins Tom20, Tom70, Prohibitin, Parkin, VDAC in the myocardium of rats under the influence of melatonin (MT) was studied. MT stabilizes mitochondrial function, which makes it possible to consider it as a potentially effective drug for mesenchymal stem cell transplantation.

Keywords: mesenchymal stem cells; mitochondria; melatonin; immunohistochemistry; expression of mitochondrial proteins.

Митохондрии (МТХ) являются важными клеточными органеллами, которые кроме выработки и обеспечения клетки энергией, осуществляют целый ряд биологически значимых функций — от участия в клеточном обновлении до осуществления эндогенных механизмов реализации клеточного иммунитета. Изучение структурно-функциональной организации МТХ чрезвычайно важно и перспективно для разработки таргетных путей действия фармакологических препаратов при различной патологии и старении организма. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) широко используются в регенеративной медицине, благодаря их способности трансдифференцироваться в различные типы клеток. Однако, при трансплантации большинство из них погибает после инъекции в поврежденную ткань. Дисфункция МТХ является основной причиной гибели МСК [1] и является критической проблемой, связанной с их выживанием после трансплантации. Мелатонин (MT) оказывает важное влияние на функции МТХ и может представлять собой потенциально эффективный кофактор для сохранения выживаемости МСК после трансплантации. Мелатонин также синтезируется в митохондриях [2], он является мощным эндогенным поглотителем свободных радикалов, уменьшает окислительный стресс, способствует образованию туннельных нанотрубок и переносу МТХ между клетками через соединительные каналы, активирует разобщающие белки и подавляет

провоспалительную реакцию [3]. Нами изучена экспрессия митохондриальных белков в миокарде старых крыс линии Вистар (18 мес.) под действием МТ для выяснения возможного механизма его таргетного действия. Животным опытной группы было проведено ежедневное внутримышечное введение МТ (0,02 мкг/кг веса) 1 раз в сутки в течение 7 дней. В качестве растворителя использовали физиологический раствор (Sol. NaCl 0,9%). Животным контрольной группы было проведено в/м введение физиологического раствора (Sol. NaCl 0,9%) в адекватном объеме. На 8-й день производили аутопсию. Объектом исследования был выбран миокард (левый желудочек), как ткань с преимущественно внутренним типом регенерации и преобладанием во внутренней структуре клеток большого количества органелл, в том числе митохондрий. Проводили гистологическое, иммуногистохимическое и морфометрическое исследование. При введении МТ отмечается усиление экспрессии митохондриальных белков Tom20 и Tom70 в кардиомиоцитах крыс, что приводит к более сильному иммунному ответу, а также к активации митохондриальных сигнальных белков, которые обеспечивают защиту против инфекции. Усиление экспрессии митохондриального белка Prohibitin при введении МТ приводит к снижению уровня мтДНК, усилению аутофагии поврежденных митохондрий. Снижение экспрессии белка Parkin под действием МТ приводит к уменьшению повреждения митохондрий путем ослабления «убиквитинового» пути. Усиление экспрессии белка VDAC под действием МТ усиливает формирование ионных каналов в мембране митохондрий. Таким образом, полученные данные позволили установить выраженное регулирующее влияние МТ на функцию митохондрий и выявить молекулярные мишени его таргетного действия, которыми являются вышеуказанные изученные сигнальные молекулы. Такое стабилизирующее влияние МТ на функцию митохондрий может лежать в основе его фармакологического действия как потенциально эффективного препарата при трансплантации МСК.

Список литературы

1. Wang J., Li H., Yao Y., et al. Stem cell-derived mitochondria transplantation: a novel strategy and the challenges for the treatment of tissue injury // *Stem Cell Res Ther.* 2018. Vol. 9, N 1. ID 106. doi: 10.1186/s13287-018-0832-2
2. Reiter R.J., Tan D.X., Rosales-Corral S., et al. Mitochondria: Central organelles for melatonin's antioxidant and anti-aging actions // *Molecules.* 2018. Vol. 23, N 2. ID 509. doi: 10.3390/molecules23020509
3. Reiter R.J., Rosales-Corral S., Tan D.X., et al. Melatonin as a mitochondria-targeted antioxidant: one of evolution's best ideas // *Cell Mol Life Sci.* 2017. Vol. 74, N 21. P. 3863–3881. doi: 10.1007/s00018-017-2609-7

Кисель А.А.¹ ✉, Исаева Е.В.¹, Якимова А.О.¹, Барановский Д.С.¹, Клабуков И.Д.¹⁻³, Иванов С.А.¹, Шегай П.В.¹, Каприн А.Д.¹

Влияние гидрогелевого состава на основе коллагена высокой концентрации и желатиновых гранул для экструзионной 3D-биопечати на хондрогенную дифференцировку культуры ММСК-ЖТ

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

³ Обнинский институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, Обнинск, Россия

✉ ki7el@mail.ru

Аннотация. Экструзионная 3D-биопечать гидрогелями является важным направлением в тканевой инженерии. Цель исследования — разработка нового гидрогелевого состава на основе коллагена и желатиновых гранул, с последующей оценкой клеточной пролиферации и экспрессии генов, связанных с хондрогенезом. В работе использовались мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из жировой ткани. Результаты показали повышенную экспрессию гена *SOX9* при использовании нового состава, что указывает на старт хондрогенной дифференцировки.

Ключевые слова: тканевая инженерия; 3D-биопечать; скаффолд; гидрогели; ММСК-ЖТ.

Kisel A.A.¹, Isaeva E.V.¹, Yakimova A.O.¹, Baranovskii D.S.¹, Klabukov I.D.¹⁻³, Ivanov S.A.¹, Shegai P.V.¹, Kaprin A.D.¹

Effect of high concentration collagen-based hydrogel formulation and gelatin granules for extrusion 3D-bioprinting on chondrogenic differentiation of AD MSCs

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

³ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

Abstract. Extrusion 3D-bioprinting with hydrogels represents a significant advancement in the field of tissue engineering. The objective of this study was to develop a novel hydrogel formulation based on collagen and gelatin granules, with an evaluation of cell proliferation and expression of genes related to chondrogenesis. In this investigation, multipotent mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue were employed. The findings demonstrated elevated *SOX9* gene expression with the novel formulation, indicative of the initiation of chondrogenic differentiation.

Keywords: tissue engineering; 3D-bioprinting; scaffold; hydrogels; AD MSCs.

Экструзионная 3D-биопечать с использованием гидрогелей представляет собой значимый и актуальный метод в тканевой инженерии. Одной из ключевых задач является исследование новых гидрогелевых составов, а также модификация существующих [1]. В большинстве исследований по реконструкции хряща используются дифференцированные клетки, такие как хондроциты и хондробласты, в качестве альтернативного источника клеточного материала можно рассмотреть липоаспират, получаемый из жировой ткани (ЖТ) пациента, который содержит мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) [2–4].

Цель работы — исследование состава на основе коллагена высокой концентрации и желатиновых гранул в качестве гидрогелевого материала для экструзионного 3D-биопринтера, с последующей оценкой пролиферации клеток, анализа экспрессии целевых генов (*SOX9*, *ACAN*, *COL1A1*, *COL2A1*, *PCNA*, *HIF1*, *BAX*, *BCL-2*, *CD105*, *CD90*, *CD73*, *CD44*, *CD29*) и генов домашнего хозяйства (*ALAS*, *GAPDH*, *GUSB*, *IPO 8*, *YWHAZ*) внутри скаффолдов *in vitro*.

Материалы и методы: Экспериментальные исследования были выполнены с использованием ММСК-ЖТ человека 8 пассажа. Для приготовления 1 мл исследуемого состава использовали 500 мкл коллагена 80 мг/мл («Имтек», Россия), 250 мкл Tris-HCl 100 мМ («ПанЭко», Россия), 250 мкл клеточной суспензии в питательной среде DMEM («Gibco», США), 6,25 мг желатиновых гранул (G1890, «Sigma-Aldrich», плотность геля 300 г Bloom). Все процедуры биопечати проводили на биопринтере 3D Invivo («Rokit», Южная Корея). Изучались две группы скаффолдов: полученные на основе печати 4%-коллагенового гидрогеля, полученные с помощью исследуемого состава гидрогеля. Напечатанные скаффолды цилиндрической формы инкубировались в питательной среде DMEM с GlutaMAX («Gibco», США) с содержанием глюкозы 4,5 г/л с добавлением 5% эмбриональной телячьей сыворотки («Biosera», Франция), пенициллина-стрептомицина (100 ЕД/мл и мкг/мл, соответственно) при стандартных условиях в течение 3, 7, 14, 21 и 28 дней. К скаффолдам по истечении срока инкубирования добавляли реагент PrestoBlue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, США). Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре INNO-S («LTeK», Южная Корея) в диапазоне длин волн 500 — 630 нм, с шагом 10 нм. Суммарную РНК из скаффолдов получали с помощью реагента ExtractRNA (Кат. № BC032, Евроген, Россия) после 21 суток культивирования скаффолдов. В качестве контроля выступала культура ММСК-ЖТ выращенная в чашках Петри ($d = 6$ см). Для определения экспрессии целевых генов и генов домашнего хозяйства использовали наборы ген-специфических праймеров (ООО «Бигль», Россия). qRT-PCR проводили согласно инструкции производителя БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue 2x (Кат. № МНС030-2040, «Биолабмикс», Россия) на приборе CFX96 Real-Time System («Bio-Rad», США).

Результаты: При культивировании скаффолдов на основе коллагенового гидрогеля и скаффолдов на основе исследуемого состава гидрогеля происходит наращивание клеточного компонента на всем сроке наблюдения. Достоверной разницы между группами скаффолдов на 3, 7, 14, 21 и 28 сутках культивирования не обнаружено ($p > 0.05$). В качестве референсных генов была выбрана пара *GUSB* и *GAPDH*. При применении метода $\Delta\Delta C_t$ для сопоставления группы коллагеновых скаффолдов и исследуемого гидрогелевого состава (по генам кандидатам) были зафиксированы значительные различия ($p < 0,0001$) в экспрессии гена *SOX9*, составляющей $12,50 \pm 1,47$ и $17,32 \pm 0,27$ соответственно.

Выводы: Включение культуры ММСК-ЖТ в разработанный состав на основе коллагена и желатиновых гранул, биопечать и дальнейшее культивирование в хондрогенной среде способствует увеличению экспрессии гена *SOX9*. Это указывает на активный процесс дифференцировки ММСК-ЖТ, так как экспрессия *SOX9* необходима на ранних стадиях хондрогенеза для индукции и поддержания фенотипа хондроцитов.

Автор Кисель А.А. поддержан грантом № 16500ГУ/2021 конкурса молодежных инновационных научно-технических проектов «УМНИК-2020» ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере».

Список литературы

1. Ahn S.H., Lee J., Park S.A., Kim W.D. Three-dimensional bio-printing equipment technologies for tissue engineering and regenerative medicine // *Tissue Eng Regen Med*. 2016. Vol. 13. P. 663–676. doi: 10.1007/s13770-016-0148-1
2. Исаева Е.В., Кисель А.А., Бекетов Е.Е., и др. Влияние коллагена и gelma в составе скаффолдов на сохранение фенотипа реберных хондроцитов в условиях *in vivo* // *Современные технологии в медицине*. 2023. Т. 15, № 2. С. 5–16. EDN: NMJCYU doi: 10.17691/stm2023.15.2.01
3. Gosset M., Berenbaum F., Thirion S., Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes // *Nature Protoc*. 2008. Vol. 3, N 8. P. 1253–1260. doi: 10.1038/nprot.2008.95
4. Baranovskii D.S., Klabukov I.D., Arguchinskaya N.V., et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies // *Stem Cell Investig*. 2022. Vol. 8, N 9. ID 7. doi: 10.21037/sci-2022-025

Клабуков И.Д.^{1,2} ✉, Барановский Д.С.^{1,2}, Евстратова Е.С.¹, Якимова А.О.¹

Переходные коннекторы производственных модулей — потенциальный объект для регулирования и мониторинга мобильных производств высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. Переходные коннекторы производственных модулей являются критическим элементом мобильных GMP-производств биологических лекарственных. Внедрение передовых технологий и строгих стандартов поможет обеспечить наивысшие стандарты качества и безопасности производства препаратов по индивидуальным назначениям.

Ключевые слова: GMP; биологические лекарственные препараты; биомедицинские клеточные продукты; надлежущая производственная практика; регенеративная медицина.

Klabukov I.D.^{1,2}, Baranovskii D.S.^{1,2}, Evstratova E.S.¹, Yakimova A.O.¹

Transition connectors: potential regulatory challenges of mobile gmp-modules for biologics and cellular products manufacturing

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Transition connectors for mobile GMP-modules are a critical element of biological and cellular manufacturing. The adoption of advanced technologies and stringent standards will help ensure the highest quality and safety standards for on-demand custom biologics manufacturing.

Keywords: biologics; biomedical cellular products; GMP; good manufacturing practices; regenerative medicine.

Современные технологии производства лекарственных препаратов «по месту оказания медицинской помощи» (point-of-care) стремительно развиваются, что делает все более реалистичным применения мобильных GMP-производств, особенно для производства биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов по индивидуальным назначениям. Концепция мобильных GMP-модулей позволяет быстро и эффективно развертывать производственные мощности в различных географических точках, что особенно важно в условиях чрезвычайных ситуаций, пандемий и других глобальных кризисов. Однако, несмотря на очевидные преимущества, мобильные GMP-производства также сталкиваются с рядом уникальных для промышленной фармации вызовов, связанных с обеспечением качества и безопасности готовой продукции. Одним из ключевых аспектов, требующих особого внимания, является стандартизация переходных коннекторов производственных GMP-модулей.

Переходные коннекторы играют критическую роль в обеспечении качества для мобильных GMP-производств, обеспечивая надежное и безопасное соединение между различными производственными модулями и их коммуникациями. Такие коннекторы должны быть спроектированы и изготовлены таким образом, чтобы минимизировать риск контаминации и обеспечить качество производства, без необходимости проведения дополнительных валидационных процедур. Отсутствие стандартизации в конструкции или монтаже коннекторов может привести к компроментации системы качества, включая нарушение

условий производства и стерильности продукта, что в конечном итоге может повлиять на качество и безопасность производимых по индивидуальному назначению терапий.

Важность переходных коннекторов подчеркивает необходимость их строгого регулирования и стандартизации, требующих разработки стандартов, касающиеся дизайна, материалов и методов испытания. Мониторинг состояния переходных коннекторов в реальном времени также является важным аспектом обеспечения качества мобильных GMP-производств. Современные технологии, такие как Интернет вещей (IoT) и системы автоматизированного контроля, могут быть использованы для постоянного отслеживания состояния коннекторов, что позволит оперативно выявлять и устранять любые отклонения или неисправности, минимизируя риски контаминации готового продукта.

Переходные коннекторы производственных модулей являются критическим элементом мобильных GMP-производств высокотехнологичных лекарственных препаратов. Надежность и качество таких коннекторов напрямую влияют на безопасность и эффективность производства препаратов по индивидуальным назначениям. Внедрение передовых технологий и строгих стандартов поможет обеспечить наивысшие стандарты качества и безопасности биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, что в конечном итоге принесет пользу пациентам.

Клабуков И.Д.^{1,2} ✉, Атякшин Д.А.³, Барановский Д.С.^{1,3}, Игнатюк М.А.³, Кисель А.А.^{1–3}, Якимова А.О.¹, Шегай П.В.¹, Каприн А.Д.^{1,3}

Иммунология регенерации хрящевой ткани: участие тучных клеток в модификации иммунологической реакции на тканеинженерную конструкцию трахеи

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Обнинский институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, Обнинск, Россия

³ Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. В нашем исследовании изучались иммунологические реакции в периимплантационной области трахеи при имплантации конструкций, созданных на основе девитализированных ксеногенных человеческих каркасов, модифицированных с помощью лазерного излучения, или таких же каркасов заселенных аллогенными назальными хондроцитами кролика.

Ключевые слова: девитализация; децеллюляризация; лазерная модификация; назальные хондроциты; регенеративная медицина; тканевая инженерия; трахея; хондроциты; хрящ.

Klabukov I.D.^{1,2}, Atiakshin D.A.³, Baranovskii D.S.^{1,3}, Ignatyuk M.A.³, Kisel A.A.^{1–3}, Yakimova A.O.¹, Shegay P.V.¹, Kaprin A.D.^{1,3}

Immunology of cartilage regeneration: involvement of mast cells in modifying the immunological response to a tissue engineered trachea graft

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

³ Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Our study investigated the immunological responses in rabbit tracheal defects repaired with devitalized xenogeneic scaffolds, either unseeded (DXS) or seeded with allogeneic nasal chondrocytes (TEC). We observed an increase in mast cells and plasma cells in the TEC group, indicating an altered immune response.

Keywords: devitalization; decellularization; laser modification; nasal chondrocytes; regenerative medicine; tissue engineering; trachea; chondrocytes; cartilage.

Количественное исследование иммунных реакций в ответ на имплантацию тканеинженерных трансплантатов, изготовленных из различных материалов, остается малоизученной научной областью. Наибольшую сложность в таких исследованиях представляет ограниченный объем экспериментальных исследований по имплантации тканеинженерных конструкций в ортотопический дефект [1]. Глубокое понимание механизмов иммунного ответа на тканеинженерный трансплантат имеет большое значение, поскольку модификация иммунного ответа позволяет существенно повлиять на эффективность заживления и ускорить нормальное восстановление тканей.

Цель нашей работы — изучить особенности иммунологических реакций в периимплантационной области трахеи при имплантации конструкций, созданных на основе девитализированных ксеногенных человеческих каркасов, модифицированных с помощью лазерного излучения (ДКК), или таких же каркасов заселенных аллогенными назальными хондроцитами кролика (ТИК) [2, 3]. Экспериментальные исследования проводили

на модели дефекта трахеи кролика при ортотопической имплантации ДКК и ТИК. Образцы трахеи окрашивали гематоксилином и сафранином O, а также иммуногистохимически окрашивали с использованием антител против триптазы, коллагена II, виментина и CD34. Иммунологические и воспалительные реакции изучали путем подсчета иммунных клеток и оценки количества кровеносных сосудов и плотности коллагена.

В интактной ткани были обнаружены триптаза-позитивные тучные клетки в виде ограниченной популяции, распределенной преимущественно в слизистой оболочке трахеи и реже в соединительной ткани между хрящевыми полукольцами. Имплантация в дефект трахеи как тканеинженерных конструкций, так и девитализированных каркасов, приводила к увеличению числа плазматических клеток и тучных клеток в периимплантационной области. В периимплантационной ткани в группе тканеинженерных конструкций была выше концентрация как тучных клеток (13 против 5 клеток на 1 мм²), как плазматических клеток (294 против 50 клеток на 1 мм²), по сравнению с группой девитализированных каркасов. Секреторная активность тучных клеток также увеличивалась в группе тканеинженерных конструкций. Интересно, что более частая колокализация тучных и плазматических клеток наблюдалась в группе тканеинженерных конструкций, тогда как при имплантации девитализированных каркасов тучные клетки чаще колокализировались с фибробластами [4]. Таким образом, впервые было выявлено влияние триптаза-позитивных тучных клеток и опосредованных ими комплексных иммунных реакций при регенерации трахеального хряща при имплантации тканеинженерной конструкции хряща.

Выводы. Заселение девитализированного ксеногенного хряща аллогенными назальными хондроцитами привело к изменению иммунологических реакций при имплантации такой конструкции. Поскольку используемые сегодня тканеинженерные конструкции различаются по своему составу и источникам клеток, вопросы количественного изменения иммунологических реакций требуют дальнейшего изучения.

Исследование частично поддержано Российским научным фондом, соглашение № 24-14-00393.

Список литературы

1. Балясин М.В., Барановский Д.С., Демченко А.Г., и др. Экспериментальная ортотопическая имплантация тканеинженерной конструкции трахеи, созданной на основе заселенного мезенхимальными и эпителиальными клетками девитализированного матрикса // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, № 4. С. 96–107. EDN: XUCCFY doi: 10.15825/1995-1191-2019-4-96-107
2. Baranovskii D., Demner J., Nürnberg S., et al. Engineering of tracheal grafts based on recellularization of laser-engraved human airway cartilage substrates // *Cartilage*. 2022. Vol. 13, N 1. ID 19476035221075951. doi: 10.1177/19476035221075951
3. Baranovskii D., Klabukov I., Isaev E., et al. Auricular cartilage tissue-engineering with gentle laser-micropore technique // *Tissue Eng Part A*. 2022. Vol. 28, N S2. P. 341–342. doi: 10.1089/ten.tea.2022.29030.abstracts
4. Klabukov I., Atiakshin D., Kogan E., et al. Post-implantation inflammatory responses to xenogeneic tissue-engineered cartilage implanted in rabbit trachea: The role of cultured chondrocytes in the modification of inflammation // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 23. ID 16783. doi: 10.3390/ijms242316783

Клабуков И.Д.¹ ✉, Савостьянов Г.А.²

Новый подход к изучению пространственной организации многоклеточности

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. Управление развитием и регенерацией тканей требует знания их пространственной организации (трехмерного строения). Клеточное объединение, названное «гистион», возникает в результате «разделения труда» между клетками и представляет собой уровень биологической организации, параметры которой отличаются большей устойчивостью по сравнению с отдельной клеткой. Такой подход расширяет существующий в регенеративной медицине набор понятий, значительно повышает точность изучения пространственной организации тканей в норме и патологии.

Ключевые слова: биология развития; гистология; пространственная организация; теория разделения труда; тканевые срезы.

Klabukov I.D.¹, Savostyanov G.A.²

A new approach to studying the spatial organization of multicellularity

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Control of tissue development and regeneration requires knowledge of its spatial organization. The cellular association, called “histon”, arises as a result of the division of labor between cells and represents a level of biological organization whose parameters are more stable than those of a single cell. This approach expands the existing set of concepts in regenerative medicine and significantly increases the accuracy of studying the spatial organization of tissues in norm and pathology.

Keywords: developmental biology; histology; spatial organization; division of labor; tissue sections.

Управление развитием и регенерацией тканей требует знания их пространственной организации (трехмерного строения). Применительно к клеточным пластам это означает знание того, как «упакованы» клетки пласта в трехмерном пространстве. Однако до сих пор теория пространственной организации клеток остается недостаточно изученной, и современная гистология в основном ограничивается двухмерными срезами. Причина заключается не только в том, что существующие методы реконструкции по серийным срезам, даже с использованием новейших микроскопических технологий и современных компьютерных алгоритмов, остаются трудоемкими и обладают ограниченной разрешающей способностью. Значительным препятствием становится и ограниченность существующих математических моделей для объяснения и интерпретации гистологических находок.

Мы предлагаем новый подход к изучению пространственной организации тканей в норме и патологии. Он основан на усовершенствовании формализованной теории строения тканей, синтезе семейства топологических и геометрических моделей пространственной организации клеточных пластов и интерпретации их сечений [1].

В рамках развития теории проведено формализованное изучение процессов специализации и интеграции клеточных типов. Это позволило установить, что элементарной морфофункциональной единицей ткани может являться не отдельная клетка, а клеточное объединение, названное «гистион». Данная многоклеточная единица возникает в результате «разделения труда» между клетками и представляет собой уровень биологической организации, параметры которой отличаются большей устойчивостью по сравнению с отдельной клеткой, и которая ранее упускалась из виду. Понятие и значение гистиона становится еще более значимым в контексте организации межклеточной коммуникации (клеточного коннектома), а также теории разделения труда в клетках и клеточных объединениях [2, 3]. Развитие гистионов можно количественно характеризовать, а их множество — систематизировать.

Гистионы в свою очередь позволяют строить функциональные композиции тканевой организации, которые служат топологическими и геометрическими моделями клеточных пластов и составляют предмет вычислительной трехмерной гистологии. Такие модели описывают не только существующие, но и потенциально возможные варианты пространственной организации [1, 2]. С помощью специальных компьютерных программ эти модели можно визуализировать, получать их сечения и сравнивать их со срезами реальных тканей. Модель, сечения которой совпадают со срезами реальной ткани, будет отражать ее пространственную организацию.

Такой подход расширяет существующий в регенеративной медицине набор понятий, значительно повышает точность изучения пространственной организации тканей в норме и патологии. Будут приведены примеры моделей гистионов, клеточных сетей и установленной трехмерной структуры реальных тканей.

Список литературы

1. Савостьянов Г.А. Структурные основы биологии развития и трехмерной гистологии. Новый подход к изучению канцерогенеза. Санкт-Петербург: Лема, 2020.
2. Савостьянов Г.А. Теория разделения труда как основа развития в биологии и обществе. Санкт-Петербург: Лема, 2023.
3. Adler M., Moriel N., Goeva A., et al. Emergence of division of labor in tissues through cell interactions and spatial cues // Cell Rep. 2023. Vol. 42, N 5. ID 112412. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112412

Клабуков И.Д.^{1,2} ✉, Барановский Д.С.^{1,2}, Якимова А.О.¹, Евстратова Е.С.¹

Система карт контрольных проверок на производстве персонализированных биомедицинских клеточных продуктов по индивидуальным назначениям

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. Ошибочные решения на производстве фармацевтических препаратов приводят к трагическим последствиям. Минимизация будущих рисков на производстве требует учета эндогенных особенностей препаратов в форме карт контрольных проверок, особенно для внутригоспитальных производств биомедицинских клеточных препаратов по индивидуальным назначениям.

Ключевые слова: GMP; карты контрольных проверок; контроль качества; надлежащая производственная практика; обеспечение качества.

Klabukov I.D.^{1,2}, Baranovskii D.S.^{1,2}, Yakimova A.O.¹, Evstratova E.S.¹

Checklist system for manufacturing personalized biomedical cell products according to individual prescriptions

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Erroneous decisions in the manufacture of pharmaceuticals can have tragic consequences. Minimizing risk in the production of biologics requires that the endogenous characteristics be considered in the form of checklists, especially for the in-hospital production of biomedical cellular products on individual prescriptions.

Keywords: checklists; quality control; GMP; good manufacturing practices; quality assurance.

Ошибочные решения на производстве фармацевтических препаратов приводят к трагическим последствиям. Согласно рыночным прогнозам, объем глобального рынка препаратов генной и клеточной терапии увеличится с \$18,61 млрд в 2022 г. до \$93,78 млрд к 2030 г. со среднегодовым темпом роста (CAGR) 22,41%. Соответственно, будет расти не только объем, но и номенклатура геннотерапевтических и соматоклеточных лекарственных препаратов различного типа. Поскольку опыт применения правил надлежащей производственной практики (GMP) в отношении конкретных лекарственных препаратов не всегда может успеть за прогрессом в области новых биомедицинских технологий, производство может сталкиваться с внезапным появлением неизвестных ранее рисков обеспечения качества препарата [1, 2]. Одной из причин внезапного появления таких рисков является сложная природа новых биомедицинских препаратов, в отношении которых пока отсутствует значительный опыт производственной практики.

Производство высокотехнологических лекарственных препаратов (ВТЛП) и биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) отличается от традиционных лекарственных препаратов большей чувствительностью («эффект бабочки») к факторам производства, хранения и внешнего воздействия. Своевременный учет данных рисков в стандартных операционных процедурах зачастую требуют не только пересмотра всей документации по обеспечению качества, но и дополнительной валидации новых методов контроля качества. Следовательно минимизация будущих рисков на производстве требует учета эндогенных особенностей

геннотерапевтических и соматоклеточных лекарственных препаратов, например в форме карт контрольных проверок (checklists, или чек-листы).

Данные производственные чек-листы разработаны с учетом специфических характеристик каждого типа препарата, включая его молекулярную структуру или клеточный фенотип, механизмы альтерации и даже потенциальные взаимодействия с биологическими системами [3]. Важным аспектом является также интеграция данных о стабильности препарата при различных условиях хранения и транспортировки, а также возможных изменениях его свойств при воздействии внешних факторов, таких как температура, влажность и даже свет. Подобная дополнительная система превентивного снижения рисков будет особенно актуальна для внутригоспитальных производств биомедицинских клеточных препаратов по индивидуальным назначениям.

Список литературы

1. Shariatzadeh M., Chandra A., Wilson S.L., et al. Distributed automated manufacturing of pluripotent stem cell products // *Int J Adv Manuf Technol.* 2020. Vol. 106. P. 1085–1103. doi: 10.1007/s00170-019-04516-1
2. Roseti L., Serra M., Bassi A., et al. Failure mode and effects analysis to reduce risks of errors in the good manufacturing practice production of engineered cartilage for autologous chondrocyte implantation // *Curr Pharm Anal.* 2016. Vol. 12, N 1. P. 43–54. doi: 10.2174/1573412911666150604233714
3. Smirnova A., Yatsenko E., Baranovskii D., Klabukov I. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in skin wound healing: the risk of senescent drift induction in secretome-based therapeutics // *Mil Med Res.* 2023. Vol. 10, N 1. ID 60. doi: 10.1186/s40779-023-00498-0

Ключевев Т.О.¹ ✉, Юрканова М.Д.¹, Пешкова М.А.¹, Кошелева Н.В.¹, Власова И.И.¹, Тимашев П.С.^{1,2}

Модуляция воспалительного ответа макрофагов экзосомами и матрикс-связанными нановезикулами, полученными из мезенхимальных стромальных клеток пуповины человека

¹ Институт регенеративной медицины, Сеченовского Университета, Москва, Россия

² Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ timofey_klyucherev@mail.ru

Аннотация. Экзосомы и матрикс-связанные нановезикулы из мезенхимальных стромальных клеток пуповины обладают противовоспалительной активностью, снижая воспалительную активацию M1 макрофагов *in vitro*, ослабляя дегенеративные и воспалительные процессы в хрящевой ткани у крыс с остеоартритом коленного сустава.

Ключевые слова: поляризация макрофагов; остеоартрит; мезенхимальные стромальные клетки; экзосомы; матрикс-связанные нановезикулы.

Klyucherev T.O.¹, Yurkanova M.D.¹, Peshkova M.A.¹, Kosheleva N.V.¹, Vlasova I.I.¹, Timashev P.S.^{1,2}

Modulation of macrophage inflammatory response by exosomes and matrix-bound nanovesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stromal cells

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

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

Abstract. Exosomes and matrix-bound nanovesicles from umbilical cord mesenchymal stromal cells possess anti-inflammatory activity, reducing the inflammatory activation of M1 macrophages *in vitro* and mitigating degenerative and inflammatory processes in the cartilage tissue of rats with knee osteoarthritis.

Keywords: macrophage polarization; osteoarthritis; mesenchymal stromal cells; exosomes; matrix-bound nanovesicles.

Остеоартрит (ОА) — наиболее распространенное хроническое заболевание суставов, характеризующееся дегенерацией хряща и развитием воспалением синовиальной оболочки. Внеклеточные везикулы (ВВ) из мезенхимальных стромальных клеток (МСК) рассматриваются как перспективное средство для лечения ОА, поскольку они могут модулировать воспаление и поддерживать жизнеспособность клеток хрящевой ткани. Помимо экзосом исследователи выделяют ВВ, связанные с компонентом внеклеточного матрикса, а именно матрикс-связанные нановезикулы (МСВ) [1]. В нескольких исследованиях был показан выдающийся терапевтический потенциал МСВ, в первую очередь он обусловлен иммуномодулирующей активностью посредством изменения провоспалительного фенотипа макрофагов M1 в сторону противовоспалительного M2. [2] Наряду с экзосомами из МСК МСВ, выделенные из МСК, могут потенциально иметь высокий терапевтический потенциал в управлении воспалительным процессом при ОА. В этом исследовании было проведено сравнение терапевтического потенциала МСВ и экзосом из МСК пуповины человека (МСК-П) на животной модели ОА, а также было оценено их влияние на модуляцию фенотипов макрофагов.

В исследовании использовались ВВ, полученные из секрета (экзосомы), и внеклеточного матрикса (МСВ) МСК-П. Оба типа ВВ 100 мкг/мл в пересчете на белок были добавлены к макрофагам вместе с индукторами поляризации в фенотипы M1 (IFN- γ +LPS) и M2 (IL-4). На 8 сутки клетки лизировались для измерения

основных маркеров поляризации макрофагов (TNF- α , IL-6, CD-206) с помощью количественной ПЦР с обратной транскрипцией (qRT-PCR). Параллельно был отобран секретом макрофагов на анализ секреции TNF- α , IL-6 методом иммуноферментного анализа. Помимо измерения основных маркеров поляризации макрофагов с помощью qRT-PCR был исследован механизм действия ВВ на поляризацию макрофагов, где была проанализирована экспрессия мРНК NF- κ B, и Stat-1/Stat-2/IRF-9. ОА у крыс моделировали путем менискоэктомии, и на 21 сутки проводили инъекции МСВ, экзосом 300 мкг/мл в пересчете на белок в группах лечения и PBS в группе с индуцированным ОА. На 21 сутки после лечения ОА животных выводили из исследования, образцы коленных суставов подвергали гистологическому исследованию. Образцы окрашивали гематоксилин-эозином, и сафранином-О, для оценки морфологических изменений в тканях суставов, при иммуногистохимическом (ИГХ) анализе был оценен уровень экспрессии белков, связанных с воспалением TNF- α , iNOS, ARG-1. Статистические различия оценивали с помощью теста Краскела-Уоллиса с тестом множественного сравнения Данна. Р-значения $\leq 0,05$ считались статистически значимыми.

Экзосомы и МСВ МСК-П продемонстрировали способность снижать продукцию провоспалительных цитокинов IL-6 и TNF- α макрофагами M1, а также увеличивая экспрессию CD-206, что говорит об изменении фенотипа M1 макрофагов в сторону M2 фенотипа с меньшей провоспалительной активностью. В группе МСВ по сравнению с экзосомами наблюдалось более выраженное снижение экспрессии факторов, связанных с провоспалительной активацией M1 макрофагов, а именно субъединицы NF- κ B, а также сигнального пути Stat-1/Stat-2/IRF-9. При терапии ОА у крыс показала, что оба типа ВВ оказывали терапевтический эффект на развитие ОА. Однако экзосомы более выраженно способствовали сохранению структуры внеклеточного матрикса (ВКМ) гиалинового хряща, что было ближе к интактному контролю по сравнению с МСВ. Оба типа ВВ уменьшали синовит, пролиферацию синовиоцитов и лимфо-макрофагальную инфильтрацию, что свидетельствует об ослаблении воспалительного процесса в суставах. Экзосомы МСК-П более эффективно снижали уровень экспрессии воспалительных факторов TNF- α , iNOS, и увеличивали экспрессию Arg-1 в макрофагах и фибробластах синовиальной оболочки по сравнению с МСВ. Различия в терапевтическом эффекте МСВ и экзосом МСК-П могут быть связаны с различием их содержимых грузов белков и регуляторных РНК. Экзосомы из МСК-П демонстрировали более высокую насыщенность белками, ответственными за организацию ВКМ, что играет важную роль в терапии ОА [3]. Несмотря на более выраженные эффекты МСВ на изменение поляризации макрофагов на уровне клеточной модели, терапия ОА экзосомами способствовала более лучшей патоморфологической картине коленных суставов у крыс с ОА.

В заключение, экзосомы в большей степени, чем МСВ из МСК-П, показали себя как эффективные терапевтические подходы терапии ОА, способствуя улучшению гистологической картины хрящевой ткани и снижению воспалительных процессов в синовиальной оболочке, а также в макрофагах *in vitro*.

Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», реализуемой на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Список литературы

1. Huleihel L., Hussey G.S., Naranjo J.D., et al. Matrix-bound nanovesicles within ECM bioscaffolds // *Sci Adv.* 2016. Vol. 2, N 6. ID e1600502. doi: 10.1126/sciadv.1600502
2. Huleihel L., Bartolacci J.G., Dziki J.L., et al. Matrix-bound nanovesicles recapitulate extracellular matrix effects on macrophage phenotype // *Tissue Eng Part A.* 2017. Vol. 23, N 21-22. P. 1283–1294. doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0102
3. Peshkova M., Korneev A., Revokatova D., et al. Four sides to the story: A proteomic comparison of liquid-phase and matrix-bound extracellular vesicles in 2D and 3D cell cultures // *Proteomics.* 2024. Vol. 24, N 18. ID 2300375. doi: 10.1002/pmic.202300375

Кобзева И.В.✉, Астрелина Т.А., Сучкова Ю.Б., Никитина В.А., Усупжанова Д.Ю., Брунчуков В.А.,
Михадаркина О.Г., Маливанова Т.Ф., Самойлов А.С.

Стромально-васкулярная фракция жировой ткани в персонифицированной медицине

ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

✉ t_astrelina@mail.ru

Аннотация. Стромально-васкулярная фракция (СВФ) жировой ткани — перспективный материал в регенеративной медицине. Ее состав и свойства зависят от состояния донора, метода забора и обработки жировой ткани, способа применения. Накопление научного и клинического материала о СВФ является актуальной задачей.

Ключевые слова: стромально-васкулярная фракция; жировая ткань; персонифицированная медицина; регенеративная медицина.

Kobzeva I.V., Astrelina T.A., Suchkova Yu.B., Nikitina V.A., Usupzhanova D.Yu., Brunchukov V.A.,
Mikhadarkina O.G., Malivanova T.F., Samoilov A.S.

Stromal-vascular fraction of adipose tissue in personalized medicine

State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Stromal vascular fraction (SVF) of adipose tissue is a promising material in regenerative medicine. Its composition and properties depend on the donor's condition, the method of collecting and processing tissue, and the method of application. Accumulation of scientific about SVF is an urgent task.

Keywords: stromal vascular fraction; adipose tissue; personalized medicine; regenerative medicine.

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений в регенеративной медицине является применение стромально-васкулярной фракции (СВФ) жировой ткани. Ее уникальный состав, представляющий собой гетерогенный пул клеток и клеточный матрикс, все чаще привлекает специалистов различных клинических специальностей в качестве персонифицированного терапевтического средства. За счет формирования клеточной и молекулярной среды для восстановления поврежденных тканей, снижения местной воспалительной реакции, стимуляции ангиогенеза, СВФ имеет значительный потенциал при лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата, тяжелых повреждений кожных покровов и слизистых, в реконструктивно-пластической хирургии, комбустиологии и других областях медицины. На состав и свойства СВФ существенно влияют соматическое состояние донора, фазы течения заболевания, метод забора жировой ткани, метод обработки и способ применения клеточного продукта. Накопление научного и клинического материала, необходимо для проведения крупных исследований, с целью внедрения полученных результатов в повседневную клиническую практику [1, 2]. Целью нашего сообщения является представление практических результатов работы центра по обработке и подготовке жировой ткани (ЖТ) для персонифицированного применения. Материалы: с сентября 2015 года по август 2024 год с соблюдением этических норм на основании медицинской лицензии на забор, получение и трансплантацию клеток и тканей, в асептических условиях у 140 пациентов был проведен забор ЖТ путем шприцевой липосакции в нижней трети передней брюшной стенки для получения СВФ с целью терапевтического применения ($n = 90$) или криоконсервации ЖТ в качестве биологической страховки ($n = 50$). Медиана возраста пациентов составила 55 (36; 59) лет. Объем полученного липоаспирата составил 226 ± 126 мл, который в асептических условиях проходил первичную обработку для получения отмытой жировой ткани (ОЖТ) Для получения

персонализированного клеточного продукта ОЖТ подвергалась ферментативной обработке, для криоконсервации — введению криопротектора, замораживанию и хранению в парах жидкого азота. Для оценки качества криоконсервированного материала от каждого образца заготавливали тестовые аликвоты для последующего размораживания и выделения СВФ. Анализ полученной клеточной суспензии СВФ включал подсчет количества ядросодержащих клеток, определение иммунологической принадлежности методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител: CD146, CD31, CD45, CD34, CD105, CD90, CD73, определение жизнеспособности (краситель 7–AAD), определение способности образовывать первичную культуру МСК, пролиферировать и дифференцироваться в остеогенном и хондрогенном направлениях. Результаты: СВФ была получена для 90 пациентов с различными клиническими патологиями (повреждение опорно-двигательного аппарата, термическая травма, местно-лучевое повреждение кожных покровов, склероатрофический лишай, эректильная дисфункция, комбинированная травма). В каждом случае была подтверждена иммунологическая принадлежность клеточной суспензии к СВФ. До 29% клеток экспрессировали CD146, до 47% клеток — CD34, около 60% — CD105 и 90, более 30% — CD31. При исследовании популяционного состава клеток лейкоциты составляли $22,1 \pm 14,25\%$, перициты $8,9 \pm 7,6\%$, супраадвентициальные стромальные клетки — $18,4 \pm 10,2\%$, эндотелиальные клетки — $19,7 \pm 10,1\%$. Полученная СВФ была применена в 100% случаев. Первичные клеточные культуры были получены в 100% случаев, на 3 пассаже демонстрировали хондрогенный и остеогенный потенциал. При оценке СВФ ($n = 23$), полученной из контрольных образцов ранее консервированной ЖТ, было отмечено снижение жизнеспособных ЯСК до 70%, сохранялась экспрессия всех ранее определяемых иммунологических маркеров, однако отмечено изменение популяционного состава за счет снижения лейкоцитов и эндотелиальных клеток. При культивировании СВФ *in vitro* во всех случаях удалось получить первичную клеточную культуру МСК с более длительным выходом до первого пассажа, в дальнейшем пролиферативная активность и способность дифференцировки клеток не отличались от нативных образцов. Выводы: соблюдение стандартных методик забора, выделения и оценки качества получаемого персонализированного клеточного продукта (СВФ) позволяет использовать его у пациентов при ряде тяжелых заболеваний. Внедрение криоконсервации ЖТ в клиническую практику может обеспечить биологическую страховку пациента, избавить от повторных инвазивных манипуляций, а также использоваться при производстве БМКП. Однако на сегодняшний день, применение СВФ в клинической практике носит экспериментальный характер и не имеет повсеместного распространения, даже несмотря на то, что СВФ была включена в перечень объектов трансплантации. Нормативная база для ее применения остается на стадии разработки в связи с отсутствием крупных рандомизированных исследований, которые позволили бы включить введение СВФ в клинические рекомендации по лечению многих тяжелых заболеваний.

Список литературы

1. Andia I., Maffulli N., Burgos-Alonso N. Stromal vascular fraction technologies and clinical applications // *Expert Opin Biol Ther.* 2019. Vol. 19, N 12. P. 1289–1305. doi: 10.1080/14712598.2019.1671970
2. Ferreira M.Y., Carvalho Junior J.D., Ferreira L.M. Evaluating the quality of studies reporting on clinical applications of stromal vascular fraction: A systematic review and proposed reporting guidelines (CLINIC-STRA-SVF) // *Regen Ther.* 2023. Vol. 24. P. 332–342. doi: 10.1016/j.reth.2023.08.003

Кобзев М.В.✉, Пыхтина П.А., Хабекирова С.А., Диденко Н.Н.

Выделение экзосом МСК при помощи магнитной сепарации

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

✉ maximcobzev@mail.ru

Аннотация. Экзосомы играют ключевую роль в межклеточной коммуникации и могут иметь значительное влияние на регенерацию тканей. В работе приведены результаты эксперимента, в ходе которого проводились выделение экзосом МСК при помощи магнитного сепаратора и верификация метода на проточном цитометре.

Ключевые слова: экзосомы МСК; магнитный сепаратор; проточный цитометр.

Kobzev M.V., Pykhtina P.A., Khabekirova S.A., Didenko N.N.

Isolation of mscs exosomes by magnetic separation

Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. Exosomes play a key role in intercellular communication and can have a significant impact on tissue regeneration. The paper presents the results of an experiment during which MSCs exosomes were isolated using a magnetic separator and the method was verified using a flow cytometer.

Keywords: MSCs exosomes; magnetic separator; flow cytometer.

Получение фракции экзосом стволовых клеток имеет высокую актуальность в современной медицине и биологии. Экзосомы — это мелкие везикулы, которые выделяются клетками и содержат различные молекулы, такие как белки, липиды и РНК. Они играют ключевую роль в межклеточной коммуникации и могут иметь значительное влияние на регенерацию тканей [1, 2]. Разработка эффективных методов получения и очистки экзосом необходима для обеспечения их эффективности и безопасности в клинических приложениях.

Выделенную жировую ткань мыши промывали фосфатно-солевым буфером. Первичные культуры МСК жировой ткани кролика получали двумя путями:

1. Проводили механическую дезагрегацию ткани с использованием автоматизированной системы гомогенизации тканей и подготовки клеточных суспензий BD Machine (BD, США). После центрифугирования при 300 g в течение 10 минут, образец клеток получали посредством отбрасывания супернатанта, экстракции частиц осадка клеток, и суспендирования частиц осадка в среде DMEM с низким содержанием глюкозы с добавлением 10% FBS.

2. Ферментативную дезагрегацию жировой ткани проводили раствором коллагеназы 200 ЕД/мл при 37 °С в течении 4 ч. Полученную суспензию центрифугировали 10 мин при 300 g, удаляли супернатант, осадок ресуспендировали в полной среде.

Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS при концентрации 1×10^5 клеток /1 мл среды при 37 °С и 5% CO₂. Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения 80–90% конfluence монослоя клетки отделяли с помощью 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена.

Секретом МСК получали после 3–4 пассажа. Клетки открепляли с использованием 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена, трехкратно промывали стерильным раствором фосфатного буфера, центрифугируя 5 мин при 300 g и комнатной температуре между промывками, после чего вносили по 106 живых клеток в 500 мкл фосфатного буфера в лунки 24-луночного планшета. Планшет инкубировали при комнатной температуре 24 ч, после чего супернатант аспирировали, фильтровали с использованием шприцевого фильтра с диаметром пор 0,2 мкм, и центрифугировали 20 мин при 2000 g.

Фракцию экзосом изолировали при помощи магнитного сепаратора с использованием набора реагентов EV Isolation Kit CD63, mouse (Miltenyi Biotec).

Для выявления связавшихся с антителами на поверхности магнитных частиц экзосом в пробирки вносили 15 мкл антител к CD44, CD90 (THY1) и CD105, меченных флуоресцентными красителями Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 350 соответственно, и инкубировали 50 мин при 4°C.

Цитофлуориметрию выполняли на проточном цитометре Novocyt 3000 (ACEA Biosciences). В выделенной популяции экзосом анализировали медиану интенсивности флуоресценции (MFI, тыс. у.е.) в сравнении с отрицательным контролем (магнитные частицы с мечеными антителами).

Экспрессия CD44, CD90 и CD105 в группе 1 (ферментативная дезагрегация) и группе 2 (механическая дезагрегация) достоверно превышала контрольные значения, MFI составляла $415,19 \pm 25,372$, $683,24 \pm 31,268$ и $650,93 \pm 37,867$ для группы 1 и $384,24 \pm 41,067$, $702,57 \pm 27,428$ и $615,27 \pm 49,134$ для группы 2 соответственно. При этом, экспрессия указанных маркеров на поверхности экзосом, полученных от клеток опытных групп, достоверно между ними не отличалась.

Таким образом, использование описанного в настоящей работе метода позволило выделить секретом МСК (полученных как в результате ферментативной, так и механической дезагрегации жировой ткани), содержащий фракцию экзосом, которые обладали выраженной экспрессией характерных для МСК поверхностных маркеров CD44, CD90 и CD105.

При этом при использовании механической дезагрегации уровень экспрессии указанных маркеров значительно не отличался от такового при ферментативной дезагрегации, что позволяет использовать данный метод для выделения фракции экзосом.

Список литературы

1. Lotfy A., AboQuella N.M., Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials // *Stem Cell Res Ther.* 2023. Vol. 14, N 1. ID 66. doi: 10.1186/s13287-023-03287-7
2. Zhou C., Zhang B., Yang Y., et al. Stem cell-derived exosomes: emerging therapeutic opportunities for wound healing // *Stem Cell Res Ther.* 2023. Vol. 14, N 1. ID 107. doi: 10.1186/s13287-023-03345-0

Ковалев А.В.¹ ✉, Левин А.А.², Петров С.В.², Кудан Е.В.², Сенатов Ф.С.², Миронов В.А.^{1,2}

Тканевые сфероиды как строительные блоки для 3D-биопечати

¹ ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

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

✉ vladimir.vichugov54@gmail.com

Аннотация. Многоклеточные агрегаты или тканевые сфероиды представляют собой 3D-мини-ткани с максимальной плотностью клеток и возможностями для слияния тканей. На основе этой способности к слиянию тканей тканевые сфероиды были предложены в качестве строительных блоков в тканевой инженерии.

Ключевые слова: тканевые сфероиды; биочернила; микрофлюидика; строительные блоки; 3D-биопечать; точность.

Kovalev A.V.¹, Levin A.A.², Petrov S.V.², Koudan E.V.², Senatov F.S.², Mironov V.A.^{1,2}

Tissue spheroids as building blocks for 3D bioprinting

¹ N.N. Priorov National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² National University of Science and Technology MISIS, Moscow, Russia

Abstract. Multicellular aggregates or tissue spheroids are 3D minitissues with maximal cell density and capacities for tissue fusion. Based on this capacity to tissue fusion tissue spheroids have been proposed as building blocks in tissue engineering.

Keywords: tissue spheroids; bioink; microfluidics; building blocks; 3D bioprinting; fidelity.

Многоклеточные агрегаты или тканевые сфероиды представляют собой 3D-мини-ткани с максимальной плотностью клеток и возможностями для слияния тканей. На основе этой способности к слиянию тканей тканевые сфероиды были предложены в качестве строительных блоков в тканевой инженерии. Для того чтобы сделать возможной 3D-биопечать с использованием тканевых сфероидов, было разработано масштабируемое роботизированное изготовление жизнеспособных тканевых сфероидов стандартной формы и размера. Более того, несколько групп по всему миру предложили 3D-биопечать тканевых сфероидов путем смешивания их с гидрогелем [1–3]. Однако при использовании такого варианта технологии экструзионной 3D-биопечати перераспределение сфероидов было хаотичным, нерегулярным с низкой точностью, и на основе этих критериев 3D-биопечать тканевых сфероидов была низкого и нежелательного качества. Мы предположили, что разработка микрофлюидного устройства, позволяющего точно размещать один тканевый сфероид за раз, позволит усовершенствовать 3D-биопечать тканевых сфероидов за счет улучшения и оптимизации их регулярного перераспределения, жизнеспособности и точности. Микрофлюидное устройство, позволяющее точно размещать один сфероид за раз, было спроектировано, изготовлено и встроено в 3D-биопринтер экструзионного типа. С помощью этого оригинального микрофлюидного устройства также было продемонстрировано, что микрофлюидное точное размещение тканевых сфероидов позволило регулярно перераспределять тканевые сфероиды. Это улучшило точность биопечатных 3D-конструкций тканей с высоким уровнем жизнеспособности. Более того, адгезия биопечатной 3D-конструкции ткани к поверхности ткани была намного сильнее, чем обычные 3D-биопечать сфероидов внутри биочернил. Таким образом, наши данные, взятые вместе, убедительно свидетельствуют о том, что сочетание экструзионной 3D-биопечать гидрогеля с последовательным точным размещением тканевых сфероидов с использованием оригинального микрофлюидного устройства оптимизировало 3D-биопечать тканевых сфероидов.

Дальнейшая оценка описанной 3D-биопечать тканевых сфероидов с использованием микрофлюидного устройства оригинальной конструкции во время *in situ* биопечати на экспериментальных животных станет следующим логическим шагом в продвижении и оптимизации биопечати тканевых сфероидов, а также органоидов и ассемблоидов в качестве строительных блоков.

Список литературы

1. Banerjee D., Singh Y.P., Datta P., et al. Strategies for 3D bioprinting of spheroids: A comprehensive review // *Biomaterials*. 2022. Vol. 291. ID 121881. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121881
2. Decarli M.C., Seijas-Gamardo A., Morgan F.L.C., et al. Bioprinting of stem cell spheroids followed by post-printing chondrogenic differentiation for cartilage tissue engineering // *Adv Healthc Mater*. 2023. Vol. 12, N 19. ID 2203021. doi: 10.1002/adhm.202203021
3. Baptista L.S., Mironov V., Koudan E., et al. Bioprinting using organ building blocks: Spheroids, organoids, and assem-bloids // *Tissue Eng Part A*. 2024. Vol. 30, N 13-14. P. 377–386. doi: 10.1089/ten.TEA.2023.0198

Ковалев А.В.

Клеточные сфероиды в составе тканеинженерных скелетогенных оболочек

ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России, Москва, Россия

✉ kovalyov1@mail.ru

Аннотация. Слой клеточных сфероидов на коллагеновой мембране при матурации в биореакторе образует тканеинженерные скелетогенные оболочки для восстановления хрящей и костей, их регенеративный потенциал проявляется при размещении между индуцированными псевдосиновиальными мембранами и гелями костного биореактора.

Ключевые слова: клеточные сфероиды; тканевая инженерия; *in vivo* биореактор; псевдосиновиальная мембрана; регенерация; остеогенез; хондрогенез.

Kovalev A.V.

Cellular spheroids in tissue-engineered skeletogenic membranes

N.N. Priorov National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. A layer of cellular spheroids on a collagen coating forms tissue-engineered skeletogenic membranes during the maturation in bioreactors for cartilage and bone restoration; the regenerative potential of the produced membranes in animal experiments is manifested under conditions of their positioning between induced pseudosynovial membranes (MIMT) and gels of a specific bone bioreactor.

Keywords: cell spheroids; tissue engineering; *in vivo* bioreactor; pseudosynovial membrane; regeneration; osteogenesis; chondrogenesis.

Клеточные сфероиды относят к строительным блокам органов: они позволяют имитировать естественную микросреду живых тканей, увеличивать межклеточные взаимодействия и накапливать собственный внеклеточный матрикс, что способствует сохранению жизнеспособности клеток и повышает эффективность их приживления после трансплантации [1]. Однако разрозненные сфероиды сложно удерживать в нужных локусах не только при трансплантации, но и на этапах биофабрикации. Для получения множества сфероидов необходимо наращивание существенного количества клеточной биомассы, поэтому тактика заполнения сфероидными значительных по объему дефектов скелетных тканей неоптимальна, тем более что в аваскулярной центральной части дефекта клеточное дыхание и питание обеспечить невозможно.

В работе изучалось слияние клеточных сфероидов, предварительно полученных в агарозных лунках (MicroTissues, Inc.), путем агрегации культивированных клеток камбиальных слоев надкостницы или субпериостальных регенеративных бластем молодых кроликов, а также спонтанного прикрепления однорядного слоя сфероидов к коллагеновой мембране (1-й тип коллагена), полученной методом электроформования (электроспиннинга).

Тканеинженерная конструкция собиралась с помощью титановой рамки, которая устанавливалась на коллагеновой мембране сверху, клеточные сфероиды вручную с помощью аппликаторов раскладывались сплошным однорядным слоем. Далее конструкция переносилась в биореактор для созревания на 6 суток. Структура конструкта исследовалась методами электронной и лазерной сканирующей микроскопии, гистологии, иммуногистохимии. Тканеинженерная скелетогенная оболочка имплантировалась в область посттравматических дефектов костей и хрящей животных моделей (калифорнийские кролики), но реципиентная

поверхность предварительно подготавливалась с помощью техники индукции псевдосиновиальной мембраны [2]. После удаления метилметакрилатного спейсера тканеинженерная скелетогенная оболочка сворачивалась и в форме трубы помещалась внутрь псевдосиновиальной мембраны, свободное пространство заполнялось альгинатным гелем, в составе которого присутствовали факторы роста TGF- β 1 и FGF-2 в количестве 10 нг/мл каждый или гелем на основе гиалуроновой кислоты с добавлением сурамина известных составов [3]. В динамике проводились гистологические исследования.

Было обнаружено, что клеточные сфероиды способны к одновременному прикреплению к коллагеновой мембране и слиянию с соседними сфероидами. При сворачивании конструкта в трубу целостность слоя частично слившихся сфероидов нарушалась, однако сфероиды оставались прикрепленными к мембране. Мембрана со сфероидами в качестве оболочки позволила окружить гель на основе альгинатов или гиалуронана, и стало возможным прижать ее с помощью гидрогелей к псевдосиновиальной мембране. При размещении конструкта в эксперименте на животных моделях между гелем, заполняющим дефект кости и псевдосиновиальной мембраной наблюдался регенеративный остеогенез (альгинатный гель) или хондрогенез (гиалуронан), источником которых, предположительно, являются клеточные сфероиды. В контрольной группе животных без индуцированной псевдосиновиальной мембраны регенеративный потенциал конструкта не проявлялся.

Таким образом, была продемонстрирована возможность и способ получения тканеинженерных скелетогенных оболочек из клеточных сфероидов и коллагеновых мембран. Сочетание бескафолдного тканеинженерного конструкта с коллагеновой мембраной-скаффолдом — пример реализации синтетического подхода в тканевой инженерии, который позволяет упорядочить расположение клеточных сфероидов на плоскости в составе единого конструкта в форме эластичной пластины и повысить эффективность их применения. Регенеративный потенциал сфероидов может быть проявлен только в непосредственной близости от кровеносных сосудов и при взаимодействии с ними. Сосуды псевдосиновиальной мембраны, выращенные техникой индуцированных мембран, позволяют реализовать регенеративный потенциал сфероидов.

В работе реализован биомиметический подход: тканеинженерный конструкт позволяет частично подражать известному способу репаративной регенерации органов скелета под соединительнотканью оболочками костей и хрящей (надкостницей и надхрящницей) [4]. Способ имплантации оболочек является модификацией биологической среды (биологической камеры; концептуальная основа успешного восстановления кости — diamond concept [5]) путем агрегирования остеогенных клеток в клеточные сфероиды, а также замены osteoconductive каркасов на гидрогели с факторами роста или блокатором ангиогенеза. Гидрогель с факторами роста, окруженный тканеинженерными скелетогенными оболочками, может быть также рассмотрен как новый вариант *in vivo* биореактора, размещенного внутри биологической камеры в области костного дефекта.

Список литературы

1. Baptista L.S., Mironov V., Koudan E., et al. Bioprinting using organ building blocks: spheroids, organoids, and assem-bloids // *Tissue Eng Part A*. 2024. Vol. 30, N 13-14. P. 377–386. doi: 10.1089/ten.TEA.2023.0198
2. Alford A.I., Nicolaou D., Hake M., McBride-Gagyi S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions // *J Orthop Res*. 2021. Vol. 39, N 4. P. 707–718. doi: 10.1002/jor.24978
3. Stevens M.M., Marini R.P., Schaefer D., et al. *In vivo* engineering of organs: the bone bioreactor // *PNAS USA*. 2005. Vol. 102, N 32. P. 11450–11455. doi: 10.1073/pnas.0504705102
4. Srouf M.K., Fogel J.L., Yamaguchi K.T., et al. Natural large-scale regeneration of rib cartilage in a mouse model // *J Bone Miner Res*. 2015. Vol. 30, N 2. P. 297–308. doi: 10.1002/jbmr.2326
5. Andrzejowski P., Giannoudis P.V. The 'diamond concept' for long bone non-union management // *J Orthop Traumatol*. 2019. Vol. 20, N 1. ID 21. doi: 10.1186/s10195-019-0528-0

Ковалева К.В.¹ ✉, Постников А.Б.², Серебряная Д.В.¹

Разработка модельной системы для исследования PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при фибротических изменениях в первичной культуре кардиофибробластов

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

² ОАО «Хайтест», Турку, Финляндия

✉ xenia.v.kovaleva@mail.ru

Аннотация. В данной работе проводили моделирование фибротических изменений в культуре кардиофибробластов неонатальных крыс и изучали его влияние на PAPP-A-опосредованный протеолиз IGFBP-4. Показано, что протеолиз IGFBP-4 повышается уже на ранних этапах развития фиброза.

Ключевые слова: сердечная недостаточность; фиброз; IGFBP-4; PAPP-A; IGF; протеолиз.

Kovaleva K.V.¹, Postnikov A.B.², Serebryanaya D.V.¹

Development of model system to study PAPP-A specific IGFBP-4 proteolysis in primary cardiac fibroblast culture under fibrotic change

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² HyTest Ltd., Turku, Finland

Abstract. In this study we modeled fibrotic development in rat's primary cardiac fibroblast culture and analyzed its effect on PAPP-A specific IGFBP-4 proteolysis. Study demonstrated that proteolysis of IGFBP-4 starts to increase at the early stages of fibrotic change.

Keywords: heart failure; fibrosis; IGFBP-4; PAPP-A; IGF; proteolysis.

Патологии сердечно-сосудистой системы представляют собой серьезную проблему для современного здравоохранения. Самая распространенная сердечная патология — сердечная недостаточность (СН), которой часто сопутствуют фибротические изменения миокарда. Протеолитические фрагменты IGFBP-4 (белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 4), образующиеся в результате специфического протеолиза под действием PAPP-A (Pregnancy Associated Plasma Protein A), являются прогностическими маркерами СН [1]. Также в ходе PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 происходит высвобождение IGF, который получает возможность взаимодействовать со своим специфическим рецептором и активировать механизмы в клетках, повышающие их жизнеспособность и препятствующие развитию фиброза [2]. Однако на сегодняшний день неизвестно, связано ли усиление PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при развитии СН с фибротическими изменениями в миокарде. Таким образом, целью нашей работы является разработка модельной системы развития фиброза под действием профибротического агента TGF- β в первичной культуре кардиофибробластов неонатальных крыс для исследования динамики PAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 при данном патологическом состоянии [3]. В настоящей работе мы получили первичную смешанную культуру кардиофибробластов и провели ее иммуноцитохимическую характеристику, используя антитела к α -SMA и тропонину I [4]. Содержание кардиофибробластов в полученной культуре составило 90 \pm 2%. Далее в полученных кардиофибробластах смоделировали фибротические изменения под действием 15 и 30 нг/мл TGF- β в течение 90 часов. Эффективность моделирования фибротических изменений оценили по нескольким признакам:

- 1) отсутствию негативного влияния TGF- β на жизнеспособность кардиофибробластов;
- 2) увеличению площади и интенсивности экспрессии α -SMA в кардиофибробластах в 1,4 раза;
- 3) увеличению пролиферативной и миграционной активности кардиофибробластов в 2 и в 3 раза при увеличении концентрации TGF- β соответственно. При моделировании фибротических изменений под действием 15 нг/мл TGF- β в течение 90 часов продемонстрировали, что уровень PAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 возрастает в 1,5 раз в первые 3 часа от начала протеолитической реакции. Под действием пониженных концентраций TGF- β , составляющих 5 нг/мл, также наблюдали возрастание протеолиза в 1,5 раз в первые 3 часа от начала протеолитической реакции. Таким образом, результаты настоящей работы позволяют предположить, что при развитии фибротических изменений в кардиофибробластах происходит усиление PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Оно может являться компенсаторным механизмом, способствующим высвобождению IGF на ранних этапах фибротических изменений, чтобы реализовать кардиопротекторные функции IGF и препятствовать развитию данной патологии.

Список литературы

1. Serebryanaya D.V., Adasheva D.A., Konev A.A., et al. IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A in a primary culture of rat neonatal cardiomyocytes under normal and hypertrophic conditions // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. Vol. 86. P. 1395–1406. doi: 10.1134/S0006297921110043
2. Bale L.K., Schafer M.J., Atkinson E.J., et al. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a key component of an interactive cellular mechanism promoting pulmonary fibrosis // *J Cell Physiol*. 2022. Vol. 237, N 4. P. 2220–2229. doi: 10.1002/jcp.30687
3. Hanna A., Frangogiannis N.G. The role of the TGF- β superfamily in myocardial infarction // *Front Cardiovasc Med*. 2019. Vol. 6. ID 140. doi: 10.3389/fcvm.2019.00140
4. Tarbit E., Singh I., Peart J.N., Rose-Meyer R.B. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells // *Heart Fail Rev*. 2019. Vol. 24. P. 1–15. doi: 10.1007/s10741-018-9720-1

Ковалева П.А. ✉, Черемных А.И., Булыгина И.Н., Сенатов Ф.С.

Исследование эффекта памяти формы композиционных материалов на основе ПЛА с различной надмолекулярной структурой для применения в тканевой инженерии

Университет МИСИС, Москва, Россия

✉ zhukova.pa@yandex.ru

Аннотация. В работе представлено исследование эффекта памяти формы (ЭПФ) в композиционных материалах ПЛА/диопсид с различными надмолекулярными структурами. Изучено влияние наполнителя на структуру, термомеханические свойства и восстановление формы, а также показана эволюция структуры в процессе реализации ЭПФ.

Ключевые слова: полимерные материалы; композиционные материалы; эффект памяти формы; полилактид; биокерамика; надмолекулярная структура.

Kovaleva P.A., Cheremnykh A.I., Bulygina I.N., Senatov F.S.

Investigation of the shape memory effect of PLA/diopside composite materials with different supramolecular structures for use in tissue engineering

National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia

Abstract. The study of the shape memory effect (SME) in PLA/Diopside composite materials with various supramolecular structures is presented. The influence of the filler on the structure, thermomechanical properties and shape recovery is considered, and the evolution of the structure in the process of SME realization is shown.

Keywords: polymer materials; composite materials; shape memory effect; polylactide; bioceramics; supramolecular structure.

Полимерные материалы все чаще находят применение в медицине, например, для создания имплантатов для восстановления тканей и органов или замещения их функций [1]. Важными критериями являются биосовместимость материалов, отсутствие иммунного ответа организма, а также способность стимулировать регенерацию тканей и постепенное безопасное разложение и вывод из организма.

Разработка функциональных полимерных материалов для регенеративной медицины ставит новые задачи в области использования «умных» материалов, таких как, например, полимеры с памятью формы. Способность материалов фиксировать временную форму и восстанавливать первоначальную под внешним стимулом может использоваться для сапомозиционирующихся ортопедических изделий или самоустанавливающихся костно-хрящевых имплантатов сложной формы. Однако управление процессом восстановления формы, его точность, а также возникающие напряжения в материале при восстановлении остаются сложно-регулируемыми и требуют более глубокого изучения.

Синтетические полимеры, такие как поликапролактон (ПКЛ) и полилактид (ПЛА) [2], широко применяются в медицине. Они обладают хорошими механическими свойствами, но слабо взаимодействуют с тканями, по сравнению с натуральными материалами. Поэтому исследователи разрабатывают композиционные материалы с биоактивными наполнителями, например, кальций-фосфатной или силикатной керамикой [3]. Эти наполнители повышают биоактивность материала и влияют на его физико-механические свойства.

Объектом исследования в этой работе является реализация эффекта памяти формы (ЭПФ) в композиционных материалах, на основе полилактида. Эффект памяти формы в полимере обусловлен подвижностью молекулярных цепей и зависит от степени кристалличности и структурной организации полимера. В связи с этим на основе матрицы ПЛА были разработаны композиционные материалы с дисперсным наполнителем в виде диопсида ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) [4], обладающие различными надмолекулярными структурами, такими как сферолиты и аморфно-ламеллярные структуры. Для композиционных материалов было исследовано влияние биоактивного наполнителя на структурную организацию полимерной матрицы, а также влияние наполнителя и типа надмолекулярной структуры на термомеханические свойства и основные параметры эффекта памяти формы. Особенностью этой работы является также исследование и визуализация эволюции структуры в процессе реализации ЭПФ.

Исследование выполнено при поддержке РФФ (№ 21-73-20205).

Список литературы

1. Khan M.U.A., Aslam M.A., Abdullah M.F.B., et al. Recent perspective of polymeric biomaterial in tissue engineering — a review // *Mater Today Chem.* 2023. Vol. 34. ID 101818. doi: 10.1016/j.mtchem.2023.101818
2. Khouri N.G., Bahú J.O., Blanco-Llamero C., et al. Polylactic acid (PLA): Properties, synthesis, and biomedical applications — a review of the literature // *J Mol Struct.* 2024. Vol. 1309. ID 138243. doi: 10.1016/j.molstruc.2024.138243
3. Rajendran A.K., Anthraper M.S.J., Hwang N.S., Rangasamy J. Osteogenesis and angiogenesis promoting bioactive ceramics // *Mater Sci Eng.* 2024. Vol. 159. ID 100801. doi: 10.1016/j.mser.2024.100801
4. Bulygina I.N., Karshieva S.S., Permyakova E.S., et al. *In vitro* evaluation of doxorubicin release from diopside particles on MG-63 and HF spheroids as a 3D model of tumor and healthy tissues // *Toxicol in Vitro.* 2024. Vol. 98. ID 105830. doi: 10.1016/j.tiv.2024.105830

Коваленко Е.И. ✉, Алексеева Н.А., Вавилова Ю.Д., Бойко А.А., Стрельцова М.А.

Гетерогенность пролиферативного ответа НК-клеток в зависимости от стадии дифференцировки при накоплении *in vitro*

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ lenkovalen@mail.ru

Аннотация. Использование НК-клеток в адоптивной иммунотерапии возможно после их накопления *in vitro*. В данной работе мы сравнили пролиферативные ответы субпопуляций НК-клеток на разных стадиях дифференцировки, в том числе при стимуляции пептидом HCMV, представленным HLA-E⁺ модифицированными фидерными клетками.

Ключевые слова: НК-клетки; гетерогенность НК-клеток; экспансия НК-клеток; фидерные клетки; HLA-E; CD57; NKG2A; NKG2C.

Kovalenko E.I., Alekseeva N.A., Vavilova Yu.D., Boyko A.A., Streltsova M.A.

Heterogeneity of the proliferative responses of NK cells depending on the stage of differentiation during accumulation *in vitro*

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The use of NK cells in adoptive immunotherapy is possible after their accumulation *in vitro*. In this work, we compared the proliferative responses of NK cell subsets at different stages of differentiation, including under the HCMV peptide stimulation presented by HLA-E⁺ gene-modified feeder cells.

Keywords: NK cells; NK cell differentiation; NK cell expansion; feeder cells; HLA-E; CD57; NKG2A; NKG2C.

Перспективность НК-клеток как терапевтических агентов определяется их врожденной способностью уничтожать опухолевые и вирус-инфицированные клетки без предварительного праймирования и жесткой рестрикции по МНС, а также относительной безопасностью в условиях аллогенной трансплантации. Для использования НК-клеток в клинике критично их накопление *in vitro*, поскольку терапевтические эффекты зависят от их количества, жизнеспособности и функциональной активности, а эти клетки составляют лишь небольшую часть дифференцировки, экспрессией рецепторов и «адаптивным» ответом в организме донора усложняет возможность предсказать, эффекторы какого качества и в каком количестве будут получены на выходе после процедуры экспансии *in vitro*. Следовательно, востребован более детальный анализ пролиферативной активности разных подтипов НК-клеток в зависимости от стадии дифференцировки и вида стимуляции. Нами было проведено сравнение экспансии субпопуляций НК-клеток, различающихся степенью дифференцировки, а также экспрессией рецептора NKG2C, который маркирует «адаптивные» НК-клетки, развивающиеся при цитомегаловирусной инфекции (HCMV), в ответ на стимуляцию интерлейкинами широко распространенный вариант IL-2 в сочетании с фидерными клетками, экспрессирующими мембраносвязанный IL-21 [1]. Таким образом, нами была оценена пролиферативная активность основных подтипов НК-клеток NK1, NK2 и NK3 [2]. Для этого с помощью клеточного сортировщика были получены клональные (1 клетка) и/или микро- (100 клеток) культуры НК-клеток с исходным фенотипом CD56^{bright}/dimCD57^{+/-}NKG2C^{+/-}. В ряде экспериментов дополнительно применялось деление на субпопуляции NKG2A^{+/-} или KIR^{+/-}. Чтобы проверить, дает ли преимущество в экспансии стимуляция пептидом VMAPRTLFL, происходящим из белка UL40 варианта HCMV, нами были получены фидерные клетки K562-21E, экспрессирующие HLA-E [3]. В большинстве экспериментов наименьшую пролиферативную

активность проявляли высокодифференцированные NK-клетки CD57+, тогда как в малочисленной низкодифференцированной субпопуляции CD56bright (NK2) наибольшее количество NK-клеток в ответ на стимуляцию производили клональные культуры. Тем не менее наиболее высокий уровень экспансии наблюдался в кластере NK1 зрелых NK-клеток CD56dim, негативных по CD57 и экспрессирующих активирующие рецепторы KIR2DL2/3 и NKG2C. Высокодифференцированные CD57+NKG2C+ NK-клетки некоторых HCMV-серопозитивных доноров, экспрессирующие NKG2A, демонстрировали повышенный пролиферативный потенциал; уровень экспансии этих клеток увеличивался при инкубации с HCMV-пептидом и HLA-E-экспрессирующими фидерными клетками.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00503.

Список литературы

1. Denman C.J., Senyukov V.V., Somanchi S.S., et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained *ex vivo* proliferation of human natural killer cells // PLoS One. 2012. Vol. 7, N 1. ID e30264. doi: 10.1371/journal.pone.0030264
2. Rebuffet L., Melsen J.E., Escalière B., et al. High-dimensional single-cell analysis of human natural killer cell heterogeneity // Nat Immunol. 2024. Vol. 25, N 8. P. 1474–1488. doi: 10.1038/s41590-024-01883-0
3. Alekseeva N.A., Streltsova M.A., Vavilova J.D., et al. Obtaining gene-modified HLA-E-expressing feeder cells for stimulation of natural killer cells // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16, N 1. ID 133. doi: 10.3390/pharmaceutics16010133

Коваль О.А.^{1,2} ✉, Жильникова М.В.^{1,2}, Зверева С.П.¹, Бiryukov М.М.^{1,2}, Варламов М.Е.¹, Станишевская О.М.^{1,3}, Черных Д.В.^{1,3}, Атаманов В.В.^{1,3}

Продукция VEGF-A в условиях гипоксии и взаимосвязь с потенциалом к метастазированию клеток увеальной меланомы человека

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

✉ o.koval@niboch.nsc.ru

Аннотация. Мы показали, что существует взаимосвязь между изменением продукции VEGF-A в ответ на гипоксию и способностью культивируемых клеток увеальной меланомы человека к индукции отдаленных метастазов, тогда как высокий базовый уровень продукции VEGF-A клетками не отражает потенциал к метастазированию.

Ключевые слова: увеальная меланома; VEGF; гипоксия; опухолевые модели.

Koval O.A.^{1,2}, Zhilnikova M.V.^{1,2}, Zvereva S.P.¹, Biryukov M.M.^{1,2}, Varlamov M.E.¹, Stanishevskaya O.M.^{1,3}, Chernich D.V.^{1,3}, Atamanov V.V.^{1,3}

Production of VEGF-A factor under hypoxia and correlation with metastasis potential of human uveal melanoma cells

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ S.N. Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, the Novosibirsk Branch, Russia

Abstract. We have shown that there is a relationship between changes in VEGF-A production in response to hypoxia and the potential of cultured human uveal melanoma cells to induce distant metastasis, whereas high baseline levels of VEGF-A do not reflect the potential for metastasis.

Keywords: uveal melanoma; VEGF; hypoxia; tumor models.

Поиск молекулярных маркеров, предсказывающих вероятность метастазирования опухолевых клеток, актуален для своевременного выявления и лечения пациентов с высокими рисками развития метастатических форм болезни. Увеальная меланома (УМ) является наиболее распространенным первичным внутриглазным новообразованием у взрослых. При удалении первичной опухоли в 50% случаев развиваются метастазы, которые являются основной причиной гибели пациентов с УМ. Метастазирование клеток УМ происходит через периферические кровеносные сосуды, что отличает её от других онкопролиферативных заболеваний [1]. Эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF-A) секретируется опухолевыми клетками и стимулирует ангиогенез, повышая сосудистую проницаемость эндотелиальных клеток, активацию моноцитов и хемотаксис, а в случае УМ играет решающую роль в инициации отдаленных метастазов.

Целью исследования было изучение взаимосвязи между молекулярным ответом на гипоксию и потенциалом к метастазированию клеток увеальной меланомы человека. В качестве клеточных моделей использовали персональные культуры клеток увеальной меланомы, полученные из образцов опухолевой ткани пациентов. Уровень продукции клетками фактора VEGF-A определяли методом иммуноферментного

анализа, уровень поверхностных белков определяли методом проточной цитометрии [2]. Для визуализации сайтов метастазирования методом лентивирусной трансдукции были получены клетки УМ с постоянной экспрессией красного флуоресцентного белка mKate2.

Мы показали, что существует взаимосвязь между изменением продукции VEGF-A в ответ на гипоксические условия и способностью клеток УМ к индукции отдаленных метастазов, тогда как высокий базовый уровень продукции VEGF-A клетками не отражает потенциал к метастазированию. Только клетки УМ, увеличивающие продукцию VEGF-A в ответ на гипоксические условия, формировали отдаленные метастазы при внутривенном введении клеток мышам. Таким образом, анализ продукции клетками VEGF-A в ответ на гипоксию можно рассматривать как метод, выявляющий потенциал метастазирования УМ человека.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-14-00285.

Список литературы

1. Zhilnikova M.V., Troitskaya O.S., Novak D.D., et al. Uveal melanoma: molecular and genetic mechanisms of development and therapeutic approaches (Review) // *Mol Biol.* 2024. Vol. 58, N 2. P. 165–177. doi: 10.1134/S0026893324020183
2. Zhilnikova M.V., Novak D.D., Troitskaya O.S., et al. A new human uveal melanoma cell line: melanin production and molecular markers for targeted therapy // *Biochemistry (Moscow). Suppl Ser Biomed Chem.* 2023. Vol. 17. P. 165–171. doi: 10.1134/S1990750823600607

Ковальская К.В.¹ ✉, Малов С.Л.², Манукян Г.В.², Багмет Н.Н.², Холоденко Р.В.³, Ярыгин К.Н.¹,
Холоденко И.В.¹

Влияние эффероцитоза апоптотических телец, полученных из клеток глиомы, на фенотип клеток-реципиентов

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

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

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

✉ thelostcaravaggio@gmail.com

Аннотация. Проведено исследование эффероцитоза опухолевых апоптотических телец (ароBD) мезенхимными клетками (MSC). Показано, что эффероцитоз опухолевых ароBD приводит к появлению на поверхности MSC опухоль-ассоциированных маркеров и индуцирует повышение экспрессии маркера опухоль-ассоциированных фибробластов.

Ключевые слова: эффероцитоз; апоптотические тельца; глиома; ганглиозид GD2; MCK; FAP; опухоль-ассоциированные фибробласты.

Kovalskaya K.V.¹, Malov S.L.², Manukyan G.V.², Bagmet N.N.², Kholodenko R.V.³, Yarygin K.N.¹, Kholodenko I.V.¹

Glioma-derived apoptotic bodies efferocytosis affect phenotype of recipient cells

¹ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. A study of tumor apoptotic bodies (apoBD) efferocytosis by mesenchymal cells (MSC) was conducted. It was shown that efferocytosis of tumor apoBD leads to the appearance of tumor-associated markers on the surface of MSC, and also upregulates the expression of a tumor-associated fibroblast marker.

Keywords: efferocytosis; apoptotic bodies; glioma; ganglioside GD2; MSC; FAP; cancer-associated fibroblasts.

Апоптотические тельца (ароBD) представляют собой окруженные мембраной везикулы, формирующиеся в процессе апоптотической гибели клеток. Известно, что экстраклеточные везикулы, включая экзосомы, микровезикулы, ароBD, осуществляют коммуникацию между клетками [1]. В связи с этим, было выдвинуто предположение, что ароBD, происходящие из опухолевых клеток, могут передавать онкоассоциированные маркеры реципиентным клеткам, тем самым меняя их фенотип и, возможно, свойства.

В качестве реципиентных клеток использовались культуры человеческих кожных фибробластов (HDF1), печеночных и пуповинных мезенхимных стволовых клеток (L-MSC и UC-MSC соответственно). Клеточная линия глиобластомы T98g, высоко экспрессирующая онкомаркер ганглиозид GD2, использовалась для получения опухолевых ароBD путем индукции апоптоза стауроспорином.

Для оценки эффероцитоза ароBD клетками-реципиентами, клетки глиомы T98g предварительно красили флуоресцентным липофильным мембранным красителем PKH26. Анализ флуоресценции клеток, поглотивших PKH26-меченные ароBD, показал эффективный эффероцитоз опухолевых ароBD. При этом UC-MSC продемонстрировали наименее эффективный уровень поглощения ароBD по сравнению с HDF1 и L-MSC.

Для анализа «переноса» маркерных молекул в клетки, эффероцитировавшие ароBD, был выбран опухоль-ассоциированный маркер ганглиозид GD2, который высоко экспрессирован на разных типах опухолей, но отсутствует на нетрансформированных клетках [2]. Мезенхимные клетки (HDF1, L-MSC и UC-MSC)

инкубировали в присутствии глиомных аroBD в течение 6 дней, после чего их окрашивали FITC-меченными антителами, специфичными к GD2 [3]. Результаты цитометрического анализа показали, что уровень флуоресценции мезенхимных клеток, окрашенных GD2-специфичными антителами, несколько возрастал. Стоит отметить, что наиболее сильные изменения показателя относительной интенсивности флуоресценции (RFI) наблюдались в HDF1, тогда как изменение RFI UC-MSc было незначительным, что можно объяснить низким уровнем эффероцитоза.

Чтобы оценить возможность трансформации реципиентных клеток в опухоль-ассоциированные фибробласты, HDF1, L-MSc и UC-MSc, после длительной инкубации с глиомными аroBD, окрашивали антителами, специфичными к белку активации фибробластов (FAP), который является одним из ключевых маркеров фибробластов опухоли [4]. Цитофлуориметрический анализ экспрессии FAP на поверхности плазматической мембраны мезенхимных клеток продемонстрировал незначительную базовую экспрессию на HDF1 и L-MSc. UC-MSc не экспрессировали FAP. После инкубации клеток с аroBD значение RFI для HDF1 увеличилось примерно в 2 раза, тогда как изменения уровня экспрессии поверхностного FAP UC-MSc и L-MSc не наблюдались. Примечательно, что при анализе внутриклеточного уровня FAP в клетках, эффероцитированных глиомными аroBD, было зафиксировано существенное увеличение процента FAP-позитивных клеток в культуре HDF1 с 65 до 82%. Процент UC-MSc, экспрессирующих FAP, увеличился примерно на 10%, в то же время изменения внутриклеточного содержания FAP в L-MSc не наблюдались.

Проведенные исследования могут свидетельствовать об изменении фенотипа клеток, эффероцитированных аroBD глиомного происхождения, и, как следствие, о вероятности трансформации реципиентных клеток в опухоль-ассоциированные фибробласты.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00149.

Список литературы

1. Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Majouga A.G., Yarygin K.N. Apoptotic MSCs and MSC-derived apoptotic bodies as new therapeutic tools // *Curr Issues Mol Biol.* 2022. Vol. 44, N 11. P. 5153–5172. doi: 10.3390/cimb44110351
2. Sorokin M., Kholodenko I., Kalinovsky D., et al. RNA sequencing-based identification of ganglioside GD2-positive cancer phenotype // *Biomedicines.* 2020. Vol. 8, N 6. ID 142. doi: 10.3390/biomedicines8060142
3. Kalinovsky D.V., Kibardin A.V., Kholodenko I.V., et al. Therapeutic efficacy of antibody-drug conjugates targeting GD2-positive tumors // *J Immunother Cancer.* 2022. Vol. 10, N 6. ID e004646. doi: 10.1136/jitc-2022-004646
4. Zhao Z., Li T., Yuan Y., Zhu Y. What is new in cancer-associated fibroblast biomarkers? // *Cell Commun Signal.* 2023. Vol. 21, N 1. ID 96. doi: 10.1186/s12964-023-01125-0

Козин В.В.

Экспериментальный поиск эволюционно консервативных регуляторов регенерации аннелид на модели восстановления задних сегментов тела у полихеты *Alitta virens*

СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

✉ v.kozin@spbu.ru

Аннотация. Сравнительный анализ эпиморфной регенерации *Alitta virens* и других аннелид выявил наиболее консервативные индукторы клеточных источников, факторы врожденного иммунитета, регуляторы паттернирования, роста и дифференцировки бластемы.

Ключевые слова: эпиморфная регенерация; кольчатые черви; дедифференцировка; пролиферация; паттернирование; сегментация; сигналинг; нейрогуморальная регуляция.

Kozin V.V.

Experimental search for evolutionarily conservative regulators of annelid regeneration using a model of restoration of the posterior body segments in the polychaete *Alitta virens*

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. A comparative analysis of epimorphic regeneration in *Alitta virens* and other annelids revealed the most conservative inducers of cellular sources, factors of innate immunity, as well as regulators of patterning, growth and differentiation of the blastema.

Keywords: epimorphic regeneration; annelids; dedifferentiation; proliferation; patterning; segmentation; signaling; neurohumoral regulation.

Перспективной организменной моделью эпиморфной регенерации являются кольчатые черви, в большинстве своем умеющие восстанавливать целые отделы тела и ярко демонстрирующие разнообразные регуляторные явления. К известным контурам регуляции посттравматической регенерации аннелид относят межтканевые взаимодействия стенки тела и кишки, паттернирующее и трофическое воздействие на бластему со стороны центральной нервной системы (ЦНС), нейрогуморальный контроль соматического роста vs. полового созревания и некоторые конкретные системы межклеточной коммуникации (сигнальные пути факторов роста фибробластов, Wnt, ретиноевая кислота). Для выявления общих закономерностей регенерации животных на интегративном уровне целого организма представляется важным проверить участие консервативных факторов и их взаимодействие на единой модельной системе для каждого крупного таксона. Среди немногочисленных модельных видов биологии развития аннелид подходящей для обозначенной цели мы избрали морского кольчатого червя *Alitta virens*.

Основные морфогенетические события восстановления заднего конца тела ювенильных особей *Alitta virens* были изучены с помощью трехмерных реконструкций регенерата по серийным полутонким срезам, конфокальным стекам с выявлением пролиферативной метки EdU, нейромедиаторов и структурных тканеспецифичных маркеров, трансмиссионной электронной микроскопии. Изменения в ЦНС на ранних стадиях регенерации анализировали путем секвенирования транскриптома отпрепарированной брюшной нервной цепочки. Участие сигнальных каскадов FGF и Wnt была протестирована с помощью фармакологических ингибиторов и выявления экспрессии генов. Роль ювенильного гормона, вырабатываемого в головном ганглии,

устанавливали путем ампутации простомиума с последующей ампутацией задних сегментов. Полученные результаты выявили как уникальные для семейства нереид, так и более консервативные, в том числе используемые позвоночными животными, индукторы клеточных источников, факторы врожденного иммунитета, регуляторы паттернирования, роста и дифференцировки регенерационной почки.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-74-10046 на базе УНБ «Беломорская», РЦ РМИКТ и РЦ ММ СПбГУ.

Козлова М.Н.✉, Земсков В.М., Алексеев А.А., Демидова В.С., Филимонов К.А.

Комплексный анализ иммунного статуса для оценки регенераторного потенциала у пациентов с обширными ожогами

ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского» Минздрава России, Москва, Россия

✉ mkozlova@rambler.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследования иммунного статуса, включая маркеры субпопуляций гемопоэтических стволовых клеток и моноцитов, позволяющие оценить регенераторный потенциал пациента с обширными ожогами и провести успешную операцию по пластическому закрытию ожоговых ран.

Ключевые слова: регенерация; ожоги; иммунный статус; иммунодиагностика; гемопоэтические стволовые клетки; субпопуляции моноцитов.

Kozlova M.N., Zemskov V.M., Alekseev A.A., Demidova V.S., Filimonov K.A.

Comprehensive analysis of immune status to assess regenerative potential in patients with extensive burns

A.V. Vishnevsky National Medical Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. The paper presents the results of a study of the immune status, including markers of subpopulations of hematopoietic stem cells and monocytes, which make it possible to assess the regenerative potential of a patient with extensive burns and to perform a successful plastic surgery to close burn wounds.

Keywords: regeneration; burns; immune status; immunodiagnostics; hematopoietic stem cells; monocyte subpopulations.

Репарация обширных ожоговых ран зависит от состояния общего и местного иммунитета, воспалительной реакции и взаиморегуляции иммунных, стволовых клеток и макрофагов. В связи с чем, для оценки регенераторного потенциала при ожогах целесообразно применять не только традиционные методы исследования непосредственно биоптатов из ожоговых ран, но и использовать системный диагностический подход на основе комплексного анализа иммунного статуса. В настоящее время в НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского успешно применяются современные методы иммунодиагностики на основе многопараметрического анализа периферической крови пациента, позволяющие выявлять не только иммунодефицитные состояния и эффективно использовать иммуностимулирующую терапию, но и способствующие поиску и внедрению новых перспективных иммунных маркеров, включая оценку регенераторного потенциала. В настоящей работе у 55 тяжелообожженных больных с площадью ожогового поражения > 30% п.т. проведено комплексное исследование иммунного статуса (более 45 фенотипических показателей), включая анализ циркулирующих гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и субпопуляций моноцитов. Проведен динамический анализ результатов иммунного статуса на разных сроках этапного хирургического лечения, в том числе в сравнении с референсными показателями 30 здоровых первичных доноров. Статистическая обработка данных выполнена с помощью программ GraphPad Prism 7.0 и Microsoft Office Excel 2010 с использованием методов вариационной статистики и непараметрических критериев. У ряда тяжелообожженных пациентов ($n = 25$) при поступлении в Ожоговый центр выявлен глубокий дефицит общих гемопоэтических стволовых клеток $CD45^+CD34^+$, в том числе ранних субпопуляций ГСК $CD45^{dim}CD34^+CD38^-$, а также дефицит важнейшей «репаративной» субпопуляции МЗ моноцитов $CD14^+CD16^{++}$ ($p < 0,05$), что свидетельствовало о подавлении компенсаторно-приспособительных реакций гемопоэза и репарации в условиях выраженного инфекционно-воспалительного

процесса и эндогенной интоксикации организма. Стойкий дефицит CD14⁺CD16⁺⁺ субпопуляции моноцитов и ГСК сохранялся у больных с обширными и глубокими ожогами площадью более 50% поверхности тела при неблагоприятном течении ожоговой болезни с медленным заживлением ожоговых ран, лизисом аутодермотрансплантатов и вялыми грануляциями нередко на фоне наличия стойкой инвазивной раневой инфекции и гнойно-септических осложнений. Напротив, у пациентов при проведении активного хирургического лечения и успешной аутодермопластики ожоговых ран в процессе комплексного лечения восстановление уровня ГСК и субпопуляций моноцитов происходило быстрее, в среднем на 10 сутки после аутодермопластики. Кроме того, выявлены достоверно значимые позитивные изменения следующих ключевых маркеров иммунного статуса — лимфоциты общие ($p = 0,0001$), лимфоциты с экспрессией активационных молекул CD25⁺ ($p = 0,008$) и HLA-DR⁺ ($p = 0,0002$), иммунорегуляторный индекс CD4⁺/CD8⁺ ($p = 0,02$), В — лимфоциты CD21⁺ ($p = 0,002$), IgG ($p < 0,0001$). Отмечена нормализация индексов эндогенной интоксикации и показателей врожденного иммунитета, в том числе гранулоцитов с экспрессией CD64⁺ и моноцитов с экспрессией HLA-DR⁺ антигена. Таким образом, комплексный анализ иммунного статуса на клеточном и субклеточном уровне позволяет не только оценить состояние общего иммунного гомеостаза у больных с обширными ожогами, но и дает дополнительную информацию о репаративных возможностях организма и готовности больного к выполнению эффективной операции по пластическому закрытию ожоговых ран.

Кокаев Р.И., Ислаев А.А.✉, Кокаев Г.С.

Возможности профилактики эффектов гипергликемии и конечных продуктов гликирования в культуре мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов

Институт биомедицинских исследований — филиал ВНЦ РАН, Владикавказ, Россия

✉ altin_islaev91@mail.ru

Аннотация. Применение комплекса фитоадаптогенов на фоне влияния гипергликемии и конечных продуктов гликирования позволило уменьшить дегенеративные изменения клеток и негативные эффекты на регенераторный потенциал и энергетический статус фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток подкожно-жировой клетчатки.

Ключевые слова: регенерация; сахарный диабет; конечные продукты гликирования; фибробласты; мезенхимальные стволовые клетки; фитоадаптогены.

Kokaev R.I., Islaev A.A., Kokaev G.S.

Possibilities of preventing the effects of hyperglycemia and advanced glycation end products in the culture of mesenchymal stem cells and fibroblasts

Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia

Abstract. The use of a phytoadaptogens complex against the influence of hyperglycaemia and glycation end products reduced degenerative changes in cells and negative effects on regenerative potential and energy status of fibroblasts and mesenchymal stem cells of subcutaneous fat.

Keywords: regeneration; diabetes mellitus; glycation end products; fibroblasts; mesenchymal stromal cells; phytoadaptogens.

Формирование социума избыточного потребления делает всё более актуальными проблемы, связанные с нарушениями метаболизма (метаболический синдром, сахарный диабет), сопровождающимися повышением уровня глюкозы. Данные состояния зачастую сопровождаются нарушениями регенеративной способности тканей. Повышенный уровень глюкозы вызывает гликирование различных белков в организме, приводя к образованию конечных продуктов (КПГ) [1]. Во многих исследованиях отмечалось их негативное влияние на различные клетки в экспериментах *in vitro* [2]. Это может быть обусловлено связыванием КПГ со специфическими рецепторами на поверхности клеток, что приводит к активации апоптоза, гиперпродукции свободных радикалов, запуску окислительного стресса и т.д. [3]. Однако остается много невыясненных механизмов воздействия КПГ на клетки, а также путей профилактики. Учитывая это, целью работы явилось исследование возможных путей коррекции регенераторного потенциала и энергетического статуса первичной культуры прогениторных клеток подкожно-жировой клетчатки — фибробластов и мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток (МСК) — измененных повышенным уровнем глюкозы (гипергликемией) и влиянием КПГ в эксперименте *in vitro* с помощью комплекса фитоадаптогенов (КФА), содержащего экстракты Солодки голой (*Glycyrrhiza glabra*), Родиолы розовой (*Rhodiola rosea*) и Элеутерококка колючего (*Acanthopanax senticosus*). Опыты проводились на первичных культурах МСК и фибробластов подкожно-жировой клетчатки (ПЖК), полученных от крыс линии Вистар. В эксперимент вводили клетки после 3–5 пассажей, высевая

в 12 луночные культуральные планшеты по 10 тыс. клеток на лунку. Через 24 часа от пассажа стандартные питательные среды были заменены на соответствующие сериям эксперимента:

- 1) контроль (стандартная питательная среда);
- 2) контроль с КФА;
- 3) опыт — гипергликемия с КПГ;
- 4) опыт — гипергликемия с КПГ и КФА.

Гипергликемия создавалась дополнительным введением в стандартную питательную среду глюкозы для достижения соответствующей концентрации 16–20 ммоль/л. Для получения КПГ производилось термостатирование фетальной сыворотки с глюкозой в инкубаторе при 37°C. Оценка состояния клеточных культур и морфологии клеток проводилась путем визуализации с помощью фазово-контрастной микроскопии на инвертированном микроскопе (Zeiss AxioVert.A1 F1) на 5 сутки. Исследование общего количества клеток и процента живых клеток производилось на автоматическом счетчике клеток (BioRad TC20) с использованием красителя — трипанового синего. Активность митохондрий определяли путем исследования интенсивности свечения специфического потенциалзависимого флуоресцентного красителя Родамин 6G. Степень апоптоза изучалась с помощью применения двойного окрашивания акридиновым оранжевым и пропидия йодидом. При морфологическом исследовании на фоне гипергликемии околядерная зернистость большинства клеток стала менее заметной, а цитоплазма — более неоднородной с вакуолизацией и признаками распада с появлением вытянутых истонченных отростков цитолеммы. Отмечалось большое количество клеток, открепившихся от поверхности пластика. При добавлении КФА на фоне гипергликемии и воздействия КПГ эти дегенеративные изменения были менее выраженными. В культуре клеток, содержащихся в среде с повышенным уровнем глюкозы и КПГ, прирост клеток снижался почти вдвое ($p < 0,001$), как и абсолютное число живых клеток ($p < 0,001$). При этом процент живых клеток, относительно общего снижения оказался выше, чем в контрольных сериях ($p < 0,05$). Влияние КФА на фоне КПГ и высокого уровня глюкозы проявилось в восстановлении пролиферативной активности, что отмечалось в приросте как общего количества клеток ($p < 0,001$), так и количества живых клеток ($p < 0,001$) с достоверным увеличением процента живых клеток ($p < 0,01$). При окрашивании родамином отмечалась повышенная интенсивность свечения в культуре клеток с гипергликемией и КПГ, что свидетельствует о большем накоплении красителя, указывающем на повышенную энергетическую активность клеток. Применение КФА в данных условиях стабилизировало обменные процессы и приводило интенсивность свечения к контрольным значениям. Двойное окрашивание акридиновым оранжевым и пропидия йодидом на фоне гипергликемии позволило выявить большое количество погибших клеток, с ярким зеленым свечением акридинового оранжевого, связанным с конденсацией хроматина. В указанных клетках отмечена большая интенсивность красной флуоресценции, как индикатора гибели клеток. Следует отметить наличие большого процента гибели клеток, находящихся в адгезированном состоянии. Профилактическое применение КФА привело к менее выраженным явлениям апоптоза в культуре прогениторных клеток ПЖК. В заключение можно сказать, что в нашем исследовании демонстрируется неблагоприятное влияние гипергликемии и КПГ на регенераторный потенциал и энергетический статус исследуемых клеток, а также изменение их морфологической картины с появлением дегенеративных признаков. Применение КФА в этих условиях уменьшило негативные эффекты и повысило выживаемость клеток.

Список литературы

1. Гаврилова А.О., Северина А.С., Шамхалова М.Ш., Шестакова М.В. Роль конечных продуктов гликирования в патогенезе диабетической нефропатии // Сахарный диабет. 2021. Т. 24, № 5. С. 461–469. EDN: KNGKZU doi: 10.14341/DM12784
2. Zhang M., Li Y., Rao P., et al. Blockade of receptors of advanced glycation end products ameliorates diabetic osteogenesis of adipose-derived stem cells through DNA methylation and Wnt signalling pathway // Cell Prolif. 2018. Vol. 51, N 5. ID e12471. doi: 10.1111/cpr.12471
3. Chang M., Zhang B., Tian Y., et al. AGEs decreased SIRT3 expression and SIRT3 activation protected AGEs-induced EPCs' dysfunction and strengthened anti-oxidant capacity // Inflammation. 2017. Vol. 40, N 2. P. 473–485. doi: 10.1007/s10753-016-0493-1

Колесникова В.А.¹ ✉, Копылов А.М.², Павлова Г.В.^{1,3,4}

Влияние комбинации GQIcombi на пролиферативную активность глиом разной степени злокачественности

¹ ФГБУН Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

³ НМИЦ нейрохирургии им. ак. Н.Н. Бурденко, Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

✉ v.kolesnikova@ihna.ru

Аннотация. Устойчивость глиом к стандартным методам терапии может объясняться существованием популяции опухолевых глиомных стволовых клеток. Предложен принцип воздействия на опухолевые клетки глиом II–IV Grades с помощью комбинации GQIcombi, обладающей антипролиферативными и нейроиндукторными свойствами.

Ключевые слова: глиома; опухолевые стволовые клетки; G-квадруплексы; дифференцировка клеток; нейроиндукторные малые молекулы; управление пролиферативной активностью клеток.

Kolesnikova V.A., Kopylov A.M.², Pavlova G.V.^{1,3,4}

Effect of gqicombi combination on proliferative activity of different grades gliomas

¹ Institute of higher nervous activity and neurophysiology of RAS, Moscow, Russia

² A.N. Belozersky research institute MSU, Moscow, Russia

³ Institution «N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The resistance of gliomas to standard therapy methods can be explained by the existence of a population of tumor glioma stem cells. Here we propose a principle of action on tumor cells of II–IV Grades gliomas using the GQIcombi combination with antiproliferative and neuroinductive properties.

Keywords: glioma; cancer stem cells; G-quadruplexes; cell differentiation; neuroinductive small molecules; control of proliferative activity of cells.

Глиомы — группа опухолей центральной нервной системы (ЦНС), отличающихся разной степенью злокачественности. Согласно обновленной классификации опухолей ЦНС 2021 г. предложен новый подход к классификации глиом, глионейрональных опухолей и нейрональных опухолей: диффузные глиомы взрослых; диффузные глиомы низкой степени злокачественности у детей; диффузные глиомы высокой степени злокачественности у детей; «ограниченные» астроцитарные глиомы; глионейрональные и нейрональные опухоли (разнообразная группа опухолей, характеризующаяся нейрональной дифференцировкой) и эпендимомы [1].

Одной из причин возникновения устойчивости глиом к существующим видам терапии, включающей хирургическую резекции опухоли, химио- и радиотерапию, могут являться опухолевые глиомные стволовые клетки (ОГСК). Такие клетки характеризуются низкой пролиферативной активностью. Кроме них в пул опухолевых клеток входят клетки, находящиеся на разных этапах дифференцировки, для которых характерно более активное по сравнению с ОГСК деление и нечувствительность к внешним воздействиям в связи с работающей программой клеточного цикла клетки.

В нашем подходе используется принцип, в основе которого лежит изначальное ингибирование пролиферации клеток с помощью антипролиферативного G-квадруплекса (GQ), сопровождающееся запуском дифференцировки клеток в нейральном направлении 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 [2, 3].

Цель работы. Протестировать комбинацию GQIcombi (bi-(AID-1-T) + LDN-193189, SB431542 + Purmorphamine + BDNF) на культурах клеток глиом II–IV Grades.

Методы. Культуры клеток II–IV Grades были получены в результате резекции опухоли в НМИЦ нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко. Были использованы следующие клеточные культуры: Bl, Sh/fP3 (IV Grade), 22, G11 (III Grade), G13 (II Grade). Для оценки пролиферативной активности клеток после воздействия GQIcombi использовались MTS тест и эксперименты на клеточном анализаторе XCelligence RTCA S16 в режиме реального времени. Исследование пролиферативной активности проводилось на 10-й эксперимента. В качестве антипролиферативного фактора использовался G-квадруплекс bi-(AID-1-T). Добавление нейроиндукторных малых молекул проводилось по следующей схеме: на 1й день эксперимента добавлялся GQ в концентрации 37,5 мкМ, на 3-й день добавлялись малые молекулы SB (10 мкМ) и LDN (1 мкМ). На 5-й день добавлялся purmorphamine (2 мкМ). На 7-й день добавлялся последний фактор BDNF (20 нг/мл).

Результаты. Было показано, что у всех исследованных клеточных культур II–IV Grades происходит снижение пролиферативной активности клеток. Для культур IV Grade было зафиксировано снижение пролиферации клеток на 89,9% (Bl) и на 63,6% (Sh/fP3), для культур III Grade — на 96,5% (22) и на 50% (G11), для культуры II Grade G13 — на 30,8%. В экспериментах на клеточном анализаторе XCelligence RTCA S16 в режиме реального времени было отмечено, что значимым этапом в снижении пролиферативной активности клеток являлся этап добавления антипролиферативного G-квадруплекса bi-(AID-1-T).

Выводы. Комбинация GQIcombi эффективно снижает пролиферативную активность клеток глиом II–IV Grades.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075–15–2024–561.

Список литературы

1. Louis D.N., Perry A., Wesseling P., et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary // *Neuro Oncol.* 2021. Vol. 23, N 8. P. 1231–1251. doi: 10.1093/neuonc/noab106
2. Shutova M.V., Chestkov I.V., Bogomazova A.N., et al. Generation of iPS Cells from human umbilical vein endothelial cells by lentiviral transduction and their differentiation to neuronal lineage. В кн.: Ye K., Jin S., editors. *Human embryonic and induced pluripotent stem cells.* Springer protocols handbooks. Humana Press, 2011. P. 133–149. doi: 10.1007/978-1-61779-267-0_11
3. De D., Halder D., Shin I., Kim K.K. Small molecule-induced cellular conversion // *Chem Soc Rev.* 2017. Vol. 46, N 20. P. 6241–6254. doi: 10.1039/c7cs00330g

Колесникова И.С.¹ ✉, Бельчиков В.², Славина М.Ю.³, Симакина Д.К.³, Трахтман П.Е.², Свешникова А.Н.^{1,2}

Исследование влияния метода приготовления сыворотки на основе тромбоконцентратов на пролиферацию клеток

¹ ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», Москва, Россия

✉ ira.kolesnikova.00@list.ru

Аннотация. Общепринято, что для успешного культивирования клеток необходим FBS, но применение данной сыворотки для ряда культур, которые используются в клинических целях, ограничено из-за возможных ксеногенных реакций. Поэтому FBS все чаще заменяют на тромбоконцентраты, исключая подобные риски.

Ключевые слова: тромбоконцентрат; сыворотка; тромбоцитарная секреция; пролиферация клеток.

Kolesnikova I.S.¹, Belchikov V.², Slavina M.Yu.³, Simakina D.K.³, Trakhtman P.E.², Sveshnikova A.N.^{1,2}

Investigation of the effect of platelet concentrate serum preparation methods on cell proliferation

¹ Center for Theoretical Problems of Physico-Chemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Dmitry Rogachev National Medical Research Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Moscow, Russia

Abstract. It is generally accepted that FBS is necessary for successful cell culturing, but the use of this serum for a number of cultures used for clinical purposes is limited due to possible xenogenic reactions. Therefore, FBS is increasingly being replaced by platelet concentrates, excluding such risks.

Keywords: platelet concentrate; serum; platelet secretion; cell proliferation.

Содержащиеся в составе тромбоконцентратов факторы роста, интерлейкины, цитокины и другие компоненты, такие как молекулы адгезии, значительно влияют на пролиферацию клеточных культур как в совокупности, так и по отдельности [1]. Последние исследования направленные на изучение возможности применения тромбоконцентратов с целью культивирования клеточных культур для регенеративной медицины говорят о том, что в большинстве случаев пролиферативный эффект сывороток зависит от метода их приготовления и обработки тромбоцитов, так как именно в их составе содержатся основные компоненты, что оказывают влияние на рост клеток [2]. В данной работе оценивался пролиферативный эффект сывороток, приготовленных различными методами на основе тромбоконцентратов предоставленных станцией переливания крови НМИЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева МЗ РФ. Сыворотки с кодами А1-А8 были получены путем активации плазменного свертывания в стандартном тромбоконцентрате человека, хранившемся при температуре +4°C 12–168 часов. Также проводилась фильтрация сывороток со сбором фракции меньше 300 кДа. Оценка эффективности пролиферативного эффекта сывороток проводилась на различных культурах карциномы человека, таких как: MCF-7, SiHa, NCI-60 и на эпителиальной ткани почки эмбриона человека, а именно HEK-293. Концентрация исследуемых добавок не превышала 5% и анализировалась в сравнении с фетальной бычьей сывороткой (FBS). Влияние полученных сывороток на пролиферацию оценивалось методом подсчета клеток в результате МТТ-теста, а изменение морфологии оценивалось с помощью микроскопии фазового контраста. Практически у всех культур наиболее активный рост наблюдался в присутствии А3, А7

и A7 300 превышая количество клеток, выросших на FBS. Это говорит о сохранении необходимых для пролиферации клеток компонентов в тромбоцитах в течение нескольких суток хранения. В случае с HEK-293 пролиферация в A1 была значительно меньше, чем с FBS. Однако так как эксперимент с HEK-293 проводился через 7 дней после эксперимента с другими культурами, во время которого сыворотки хранились при температуре +4°C, наиболее вероятно, что сыворотки A1 имеют очень короткий срок годности, что подтверждается нашими предыдущими работами с тромбоконцентратами. Таким образом, метод приготовления сыворотки из тромбоконцентрата не влияет на его эффективность в замене FBS при культивировании клеток, однако, условия хранения тромбоконцентратов требуют дальнейшего исследования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-45-10039, <https://rscf.ru/project/23-45-10039/>.

Список литературы

1. Rodrigues R.M., de Souza V., Berger M., et al. The proteomic and particle composition of human platelet lysate for cell therapy products // *J Cell Biochem.* 2022. Vol. 123, N 9. P. 1495–1505. doi: 10.1002/jcb.30310
2. Sovkova V., Vocetkova K., Hedvičáková V., et al. Cellular response to individual components of the platelet concentrate // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, N 9. ID 4539. doi: 10.3390/ijms22094539

Колесниченко Ю.В. ✉, Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н., Шевцов М.А., Юдинцева Н.М.

Сравнительный анализ митохондриальной активности и уровней активных форм кислорода в нормальных и рубцовых фибробластах дермы

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ koles209@mail.ru

Аннотация. При формировании гипертрофических рубцов происходят изменения свойств дермальных фибробластов. В данном исследовании был выполнен сравнительный анализ уровня митохондриальной активности и активных форм кислорода у нормальных фибробластов и фибробластов, выделенных из ткани гипертрофического рубца.

Ключевые слова: гипертрофический рубец; фибробласты; митохондриальная активность; активные формы кислорода.

Kolesnichenco Yu.V., Aksenov N.D., Shatrova A.N., Shevtsov M.A., Yudintseva N.M.

Comparison analysis of mitochondrial activity and reactive oxygen species levels of normal and scar dermal fibroblasts

Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. During the formation of pathological scars, various properties of dermal fibroblasts undergo changes. This study conducted a comparative analysis of mitochondrial activity and reactive oxygen species levels in normal fibroblasts and fibroblasts isolated from hypertrophic scar tissue.

Keywords: hypertrophic scar; fibroblasts; mitochondrial activity; reactive oxygen species.

В нормальных условиях дермальные фибробласты (ДФ) способствуют поддержанию структуры и функции дермы путем синтеза и реорганизации белков внеклеточного матрикса. Восстановление глубокого или обширного повреждения кожи происходит с формированием патологических рубцов (гипертрофического или келоидного), существенную роль в котором играют ДФ. В процессе формирования рубца происходят существенные изменения в свойствах клеток: активация, увеличение пролиферативной, секреторной и метаболической активности [1, 2]. Метаболическая активность ДФ, включая изменения уровня митохондриальной активности и производства активных форм кислорода (АФК), может являться одним из ключевых факторов, влияющих на характер заживления повреждения и формирования рубцов.

Целью данного исследования было проведение сравнительного анализа уровня митохондриальной активности и АФК у нормальных фибробластов (НФБ) и у фибробластов, выделенных из ткани гипертрофического рубца (рДФ). Оценку уровня митохондриальной активности и АФК проводили с помощью метода проточной цитофлуориметрии (CytexFlexS (Beckman Coulter, США) с использованием программного обеспечения CytExpert 2.0 (Beckman Coulter, США). В качестве контроля использовали клетки без окраски, все исследования выполняли на ДФ 5–7-го пассажей. Для измерения митохондриальной активности использовали 100 мМ Tetramethylrhodamine (TMRM) (Invitrogen, США), для оценки уровня АФК применяли рабочий раствор производного флуоресцеина — CM-H2DCFDA (Invitrogen, США; NeoFroxx, Германия). При оценке митохондриальной активности и АФК использовали лазер с длиной волны 561 нм, интенсивность флуоресценции анализировали в PE- FITC-канале соответственно.

Полученные результаты выявили более высокий уровень активных форм кислорода (АФК) у нФб по сравнению с рДф, в то время как повышенную митохондриальную активность демонстрировали рДф, что может свидетельствовать об увеличении энергопотребления и метаболизма, связанных с процессами ремоделирования и заживления тканей [3–5]. Статистически значимые различия в уровнях АФК и митохондриальной активности между нФб и рДф могут отражать адаптивные изменения в метаболизме клеток, что в свою очередь вносит вклад в характер формирования рубцов. Оценка метаболических изменений в клетках и выявление ключевых моментов могут способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на оптимизацию клеточных процессов в регенерации и ремоделировании тканей.

Список литературы

1. Knoedler S., Broichhausen S., Guo R., et al. Fibroblasts — the cellular choreographers of wound healing // *Front Immunol.* 2023. Vol. 14. ID 1233800. doi: 10.3389/fimmu.2023.1233800
2. Talbott H.E., Mascharak S., Griffin M., et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis // *Pharmaceutics.* 2022. Vol. 12, N 8. ID 735. doi: 10.3390/pharmaceutics12080735
3. Talbott H.E., Mascharak S., Griffin M., et al. Wound healing, fibroblast heterogeneity, and fibrosis // *Cell Stem Cell.* 2022. Vol. 29, N 8. P. 1161–1180. doi: 10.1016/j.stem.2022.07.006
4. Rippa A.L., Kalabusheva E.P., Vorotelyak E.A. Regeneration of dermis: Scarring and cells involved // *Cells.* 2019. Vol. 8, N 6. ID 607. doi: 10.3390/cells8060607
5. Siani A., Tirelli N. Myofibroblast differentiation: main features, biomedical relevance, and the role of reactive oxygen species // *Antioxid Redox Signal.* 2014. Vol. 21, N 5. P. 768–785. doi: 10.1089/ars.2013.5724

Колос Е.А.✉, Яковлев В.С., Бекетова А.А.

Белок коннексин-43 в клетках пограничной шапочки дорсального и вентрального корешков спинного мозга крысы (сравнительное исследование)

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

✉ koloselena1984@yandex.ru

Аннотация. Исследовали малоизученные мультипотентные клетки пограничной шапочки дорсальных и вентральных корешков эмбрионального спинного мозга крыс. Установлено, что коммуникации клеток данной популяции на всех сроках ее существования обеспечиваются коннексин-43-содержащими щелевыми контактами.

Ключевые слова: клетки пограничной шапочки; коннексин-43; щелевые контакты; эмбриогенез.

Kolos E.A., Yakovlev V.S., Beketova A.A.

Connexin-43 in boundary cap cells of the dorsal and ventral root of the rat spinal cord (comparative study)

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Little studied multipotent boundary cap cells of dorsal and ventral roots of rat embryonic spinal cord were studied. It has been established that communications of cells of this population at all stages of its existence are provided by connexin-43-containing gap junctions.

Keywords: boundary cap cells; connexin-43; gap junction; embryogenesis.

Клетки пограничной шапочки (boundary cap cells, КПШ) являются производными нервного гребня и располагаются в области корешков спинного мозга в период раннего развития. КПШ представляет собой мультипотентные стволовые клетки, способные дифференцироваться в сенсорные нейроны, клетки-сателлиты, шванновские клетки и другие типы клеток [1, 2]. Актуальность изучения популяции КПШ обусловлена недостатком информации об их морфофункциональных особенностях в процессе развития нервной системы, а также необходимостью установления молекулярных механизмов их пролиферации, миграции и дифференцировки. Предполагаемый высокий потенциал использования этих клеток в терапии поврежденного спинного мозга (СМ), спинномозгового ганглия и корешков СМ подчеркивает необходимость исследования КПШ и механизмов их межклеточных коммуникаций. Целью настоящего исследования явилось изучение динамики образования межклеточных контактов клетками пограничной шапочки дорсального и вентрального корешков СМ в эмбриогенезе крысы с использованием иммуногистохимического маркера коннексин-43 (Cx43). Работа выполнена на эмбрионах крыс Вистар с 12 по 20 сут развития (E12–E20) ($n = 27$). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. Иммуногистохимическую реакцию на Cx43 проводили на парафиновых срезах с применением моноклональных мышинных антител (Santa Cruze Biotechnology, США). Для идентификации КПШ проводили иммуногистохимическую реакцию на глутаминсинтетазу, являющуюся маркером данной популяции на всех сроках ее существования [3]. Содержащие глутаминсинтетазу КПШ были обнаружены на E14–E20 в непосредственной близости к зоне входа дорсального корешка СМ и к зоне выхода вентрального корешка. Установлено, что КПШ на E14–E20 экспрессируют Cx43. Данный факт делает возможным применение коннексина-43 в качестве маркера клеток пограничной

шапочки. Предположительная роль Sx43 в клетках пограничной шапочки дорсальных корешков связана с его канальными функциями, обеспечивающими высвобождение малых сигнальных молекул в области дорсальной переходной зоны СМ. Известно, что Sx43-опосредованные кальциевые волны могут напрямую направлять рост аксонов, что делает возможным участие КПШ в ориентации афферентов чувствительных нейронов при установлении связей между спинномозговым ганглием и СМ. В вентральном корешке КПШ дифференцируются главным образом в шванновские клетки и не являются предшественниками нейронов. Роль КПШ вентральных корешков отличается от функций КПШ дорсальных корешков и заключается в регуляции миграции нейронов и глии СМ, в ограничении их выхода в область корешка. Учитывая, что КПШ вентрального и дорсального корешков выполняют различные функции, можно предположить, что они представляют собой различные популяции клеток. Этот факт необходимо учитывать при дальнейшей разработке клеточной терапии с использованием КПШ.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-10003, <https://rscf.ru/project/23-25-10003/>) и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 05.05.2023 г. № 23-25-10003.

Список литературы

1. Aquino J.B., Hjerling-Leffler J., Koltzenburg M., et al. *In vitro* and *in vivo* differentiation of boundary cap neural crest stem cells into mature Schwann cells // *Exp Neurol*. 2006. Vol. 198, N 2. P. 438–449. doi: 10.1016/j.expneurol.2005.12.015
2. Gresset A., Couplier F., Gerschenfeld G., et al. Boundary caps give rise to neurogenic stem cells and terminal glia in the skin // *Stem Cell Rep*. 2015. Vol. 5, N 2. P. 278–290. doi: 10.1016/j.stemcr.2015.06.005
3. Kolos E.A., Korzhevskii D.E. Glutamine synthetase in the cells of the developing rat spinal cord // *Russ J Dev Biol*. 2021. Vol. 52, N 5. P. 334–343. doi: 10.1134/S1062360421050040

Кондратенко А.А.¹ ✉, Басок Ю.Б.², Григорьев А.М.², Товпеко Д.В.¹, Калюжная Л.И.¹

Лиофилизированный внеклеточный матрикс пуповины человека для тканевой инженерии

¹ Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Москва, Россия

✉ kondraa24@gmail.com

Аннотация. Разработан лиофилизированный матрикс на основе децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека, который предлагается использовать в качестве скаффолда для изготовления клеточно-инженерных конструкций. Представлены результаты исследований его биосовместимости и нецитотоксичности.

Ключевые слова: вартонов студень пуповины человека; децеллюляризация; регенеративная медицина.

Kondratenko A.A.¹, Basok Yu.B.², Grigoriev A.M.², Tovpeko D.V.¹, Kalyuzhnaya L.I.¹

Dry extracellular matrix of human umbilical cord for tissue engineering

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

² Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia

Abstract. A lyophilized scaffold based on decellularized Wharton jelly is proposed to use as a scaffold for the creation of cell-engineered constructs. The results of studies of its biocompatibility and noncytotoxicity have presented.

Keywords: human umbilical cord Wharton's jelly; decellularization; regenerative medicine.

Разработка в лабораторных условиях функционально-активных клеточно-инженерных конструкций, предназначенных для реконструкции тканей или активации регенеративных резервов является одной из областей современной биомедицинской науки.

Компоненты внеклеточного матрикса, благодаря пространственной микроструктуре и наличию молекул адгезии, обеспечивают биомеханические и биохимические стимулы, необходимые для жизнедеятельности и дифференцировки клеток. Матрикса, созданные децеллюляризацией тканей и органов близко воспроизводят свойства внеклеточного матрикса. Внеэмбриональные органы в качестве биоматериала для изготовления матриксов доступны и содержат большое количество структурных волокон и факторов роста.

Лиофилизированный внеклеточный матрикс пуповины изготавливали по запатентованной технологии [1]. Определяли количество ДНК (ДНК-DU-250, Биолабмикс). Стромальные клетки жировой ткани человека ($5 \cdot 10^5$) культивировали на образцах матрикса из бесклеточной пуповины человека (10 мг) с использованием орбитального шейкера Multi Bio (Biosan, Рига, Латвия) в течение 7 и 14 дней с последующей детекцией жизнеспособности (Live/Dead assay, Invitrogen, США). Образцы бесклеточного матрикса (10 мг) имплантировали подкожно, внутримышечно и внутрикостно беспородным белым мышам ($n = 30$). Через 21 сутки из тканей областей имплантации изготавливали гистологические препараты окрашенные гематоксилином и эозином и анилиновым синим по Массону.

Разработанная технология децеллюляризации внеклеточного матрикса пуповины человека обеспечила удаление 96% ДНК. Детекция флуоресцентными красителями жизнеспособности стромальных клеток жировой ткани, активно заселявших поверхность матрикса пуповины, показала малое количество погибших

клеток. Нежелательных реакций отторжения образцов в исследованиях на мышах *in vivo* не наблюдали при всех видах имплантации.

Показана биосовместимость лиофилизированного внеклеточного матрикса пуповины человека *in vitro* и *in vivo*.

Список литературы

1. Патент РФ № 2816034/ 14.06.2023. Хоминец В.В., Калюжная-Земляная Л.И., Кондратенко А.А., и др. Способ применения бесклеточного лиофилизированного продукта из пуповины человека для заживления ран.

Коноплянников М.А.^{1,2} ✉, Замулаева И.А.³, Харин А.Ю.⁴, Еремина А.С.⁴, Каргина Ю.В.^{4,5},
Ле-Дейген И.М.⁵, Базыленко Т.Ю.^{4,5}, Матчук О.Н.³, Абрамова М.Р.³, Кальсин В.А.¹, Кузнецова С.М.¹,
Тимашёв П.С.^{2,5}, Баклаушев В.П.¹, Тимошенко В.Ю.^{4,5}

Мезопористые кремниевые наночастицы с салиномицином для противораковой терапии

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

² Сеченовский Университет, Москва, Россия

³ Медицинский радиологический научный центр, Обнинск, Россия

⁴ НИЯУ МИФИ, Москва, Россия

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

✉ mkonopl@mail.ru

Аннотация. Мезопористые кремниевые наночастицы, загруженные салиномицином, мощным ингибитором опухолевых стволовых клеток, *in vitro* оказывали заметное цитотоксическое действие на клетки глиобластомы человека и рака молочной железы, *in vivo* значительно подавляли рост и метастазы опухоли карциномы легких Льюис.

Ключевые слова: опухолевые стволовые клетки; мезопористые наночастицы; кремниевые наночастицы; салиномицин; противораковая терапия; метастазы.

Konoplyannikov M.A.^{1,2}, Zamulaeva I.A.³, Kharin A.Yu.⁴, Eremina A.S.⁴, Kargina Yu.V.^{4,5}, Le-Deigen I.M.⁵,
Bazylenko T.Yu.^{4,5}, Matchuk O.N.³, Abramova M.R.³, Kalsin V.A.¹, Kuznetsova S.M.¹, Timashev P.S.^{2,5},
Baklaushev V.P.¹, Timoshenko V.Yu.^{4,5}

Mesoporous silicon nanoparticles with salinomycin for anticancer therapy

¹ Federal Research Clinical Center of FMBA of Russia, Moscow, Russia

² Sechenov University, Moscow, Russia

³ Medical Radiological Research Centre, Obninsk, Russia

⁴ National Research Nuclear University MEPhI, Moscow, Russia

⁵ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Mesoporous silicon nanoparticles loaded with salinomycin, a potent tumour stem cell inhibitor, *in vitro* demonstrated a noticeable cytotoxic effect on human glioblastoma cells and breast cancer cells, and *in vivo* significantly suppressed the growth and metastasis of Lewis lung carcinoma.

Keywords: cancer stem cells; mesoporous nanoparticles; silicon nanoparticles; salinomycin; anticancer therapy; metastases.

Доставка лекарств с помощью наноконтейнеров — очень перспективная технология. Применение наноконтейнеров из мезопористого кремния приводит к увеличению терапевтической эффективности и снижению системной токсичности за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффекта) [1]. Большинство традиционных противораковых химиотерапевтических препаратов недостаточно селективны по отношению к опухоли. Фактически, из-за этого приходится применять крайне агрессивный подход к дозировке лекарств, что может привести к серьезной токсичности по отношению к нормальным клеткам пациента. Наноразмерные противоопухолевые препараты с трудом проникают через плотные эндотелиальные соединения нормальных кровеносных сосудов, но они могут проникать в сосудистую сеть опухоли

и задерживаться вблизи нее. Со временем концентрация препарата в опухоли превышает его концентрацию в плазме крови, что связано с отсутствием активного лимфооттока в солидной опухоли, что в итоге обеспечивает селективную доставку наноразмерных противоопухолевых препаратов на основе EPR-эффекта [2]. Наночастицы на основе мезопористого кремния, который обычно получают путем электрохимического травления кристаллического кремния, широко изучаются как материал для биомедицинского применения, благодаря своей биоразлагаемости, низкой токсичности и способности выступать в качестве носителя для различных терапевтических или диагностических препаратов [3]. Существует возможность встраивать целевые агенты в поверхность или внутрь данных наночастиц и переносить их в поврежденную ткань. Такой подход существенно повышает лекарственную специфичность и минимизирует потенциальные побочные эффекты химиопрепаратов. В нашем исследовании мезопористые кремниевые наночастицы были загружены салиномицином, перспективным препаратом, направленно ингибирующим опухолевые стволовые клетки. Загрузка и высвобождение препарата были изучены с помощью инфракрасной спектроскопии, которая выявила постепенное высвобождение препарата со скоростью, зависящей от массового соотношения между наночастицами и салиномицином. Исследования *in vitro* показали, что приготовленные наночастицы, нагруженные салиномицином (папо-Sal, массовое соотношение наночастиц и салиномицина 1 : 1), в диапазоне концентраций 10–40 мкМ, оказывают значительное цитотоксическое действие на клетки рака молочной железы MCF-7 и мультирезистентные клетки MCF-7/MDR1. В обоих типах клеток цитотоксический эффект папо-Sal после 72-длительной инкубации был значительно выше, чем у самого салиномицина. Мы наблюдали аналогичный ингибирующий эффект того же препарата папо-Sal, в концентрации 40 мкМ, в отношении другого типа клеток, высокоустойчивых к химиотерапии первичных культивируемых клеток глиобластомы человека. Мы выбрали этот тип раковых клеток, поскольку ранее было показано, что клетки глиобластомы человека также обладают множественной лекарственной устойчивостью. Наши эксперименты показали, что использование папо-Sal приводит к более сильному подавлению пролиферации клеток глиобластомы человека, чем монотерапия салиномицином. Эксперименты *in vivo* показали сильное подавление роста опухоли карциномы легких Льюис (LLC) у мышей C57BL/6 в течение 10–30 дней после внутрибрюшинного введения наноконтейнеров с салиномицином, также более эффективно, чем это наблюдалось при монотерапии с салиномицином. Известно, что клетки LLC быстро метастазируют в легкие, что является основным фактором летальности. Было обнаружено, что папо-Sal значительно ослабляет это метастазирование. Наблюдалось заметное уменьшение объема метастатической ткани легких после введения папо-Sal и несколько меньший эффект для одного лишь салиномицина. Анализируя временные зависимости жизнеспособности мышей исследуемых групп, мы показали, что выжившие мыши в группе папо-Sal составили около 42% на 60-й день, в то время как все мыши в других группах погибли. Важно, что количество выживших мышей в группе папо-Sal всегда было больше, чем в группе животных, получавших инъекции самого салиномицина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наночастицы мезопористого кремния, нагруженные салиномицином, перспективны для мягкой химиотерапии как первичных раковых опухолей, так и метастазов. Выявленная эффективность против устойчивых к химиотерапии раковых стволовых клеток и возможность внутрибрюшинного введения являются весьма перспективными для дальнейшего клинического применения данных наноконтейнерных препаратов.

Список литературы

1. Shukla T., Upmanyu N., Pandey S.P., Sudheesh M.S. Chapter 14 – Site-specific drug delivery, targeting, and gene therapy. В кн.: Grumezescu A.M., editor. Nanoarchitectonics in biomedicine. 2019. P. 473–505. doi: 10.1016/b978-0-12-816200-2.00013-x
2. Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // Adv Drug Deliv Rev. 2011. Vol. 63, N 3. P. 136–151. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009
3. Canham L. Handbook of porous silicon. Springer, 2018. 1613 p. doi: 10.1007/978-3-319-71381-6

Константинова С.В.¹ ✉, Бокша И.С.^{1,2}, Гришин А.В.¹, Лунин В.Г.¹

Медицинское применение стрептококковых эндопептидаз

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

✉ shelestit@gmail.com

Аннотация. Замена аминокислотных остатков, отвечающих за видоспецифичность к IgG в IdeC, IgG-деградирующем ферменте *Streptococcus canis*, на соответствующие остатки IdeS, IgG-деградирующего фермента *S. pyogenes*, повышает эффективность связывания IdeC с IgG человека и перспективность применения IdeC.

Ключевые слова: IgG-специфическая эндопептидаза; рекомбинантные белки; иммуноглобулин-деградирующий фермент; стрептококки; трансплантация.

Konstantinova S.V.¹, Boksha I.S.^{1,2}, Grishin A.V.¹, Lunin V.G.¹

Streptococcal endopeptidase medical applications

¹ N.F. Gamaleya Federal Research Center for Epidemiology and Microbiology n.a. Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Mental Health Research Centre, Moscow, Russia

Abstract. Substitution of amino acid residues responsible for IgG species specificity in IdeC, *Streptococcus canis* IgG degrading enzyme, with the respective residues of IdeS, *S. pyogenes* IgG degrading enzyme, increased the efficiency of IdeC binding to human IgG and the prospects for using the IdeC endopeptidase.

Keywords: IgG-specific endopeptidases; recombinant proteins; immunoglobulin degrading enzymes; streptococci; transplantation.

Общей целью регенеративной медицины и трансплантологии является восстановление утраченной функции или целостности органа. Трансплантация вызывает иммунные реакции, что препятствует решению проблем приживаемости и восстановления функции органа и успешной реабилитации организма. Иммунные реакции, препятствующие адаптации трансплантатов, связаны с усиленной выработкой иммуноглобулинов, со стимуляцией каскада свертывания крови, тромбозом, отторжением трансплантата и его гибелью. Для преодоления этих проблем успешно применяется ферментативное расщепление иммуноглобулинов из системного кровотока путем введения в него эндопептидазы IdeS с уникально высокой специфичностью к IgG человека. Имплидаза (IdeS из *Streptococcus pyogenes*) применяется в нефрологии как средство, предотвращающее гуморальную реакцию отторжения у больных при трансплантации почки [1]. Ранее мы получили в системе гетерологичной экспрессии активные рекомбинантные эндопептидазы IdeS и IdeZ [2]. Известно, что у лиц, переболевших заболеваниями, вызываемыми *S. pyogenes*, либо контактировавших с патогеном, в крови наблюдается повышенный уровень антител к IdeS, что создает угрозу развития реакций гиперчувствительности при введении IdeS. Для преодоления возможных осложнений от введения имплидазы было предложено заменить IdeS на IdeZ из *S. zooepidemicus* [3]. Возможной альтернативой могут стать препараты Ide из других микроорганизмов. Так, например, Ide из *S. canis* (IdeC) является высокоспецифичным ферментом для IgG кошек и собак, но малоэффективен в отношении IgG человека. Моделирование структур комплексов IdeC с IgG человека и собаки позволило выявить аминокислотные остатки, предположительно отвечающие за видоспецифичность фермента. Эти аминокислотные остатки в последовательности IdeC были заменены на соответствующие остатки последовательности IdeS/IdeZ,

что позволило повысить эффективность связывания IdeC с IgG человека. Применение модифицированной IdeC, антитела к которой не встречаются в человеческой популяции, повысит конкурентные свойства разработанных вариантов эндопептидаз по сравнению с имеющимися аналогами.

Список литературы

1. Montgomery R.A., Loupy A., Segev D.L. Antibody-mediated rejection: New approaches in prevention and management // *Am J Transplant.* 2018. Vol. 18, N S3. P. 3–17. doi: 10.1111/ajt.14584
2. Boksha I.S., Lunin V.G., Danilova T.A., et al. Recombinant endopeptidases IdeS and IdeZ and their potential application // *Biochemistry (Moscow).* 2023. Vol. 88, N 6. P. 731–740. doi: 10.1134/S0006297923060020
3. Elmore Z.C., Oh D.K., Simon K.E., et al. Rescuing AAV gene transfer from neutralizing antibodies with an IgG-degrading enzyme // *JCI Insight.* 2020. Vol. 5, N 19. ID e139881. doi: 10.1172/jci.insight.139881

Коптева А.✉, Герасимова Д.С., Минина А.С., Шуплецова В.В., Молоканова (Москалюк) О.А.

Жизнеспособность и остеодифференцировка ММСК на полимерных 2,5D-каркасах

БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

✉ nasta1978n@mail.ru

Аннотация. Полиэфирэфиркетон и полиамид — перспективные полимеры для остеозамещения, не уступающие по свойствам металлоконструкциям, и не имеющие их недостатки. В *in vitro* исследовании использовали культуры ММСК жировой ткани. Показано, что исследованные полимеры не влияют на показатели жизнеспособности и слабо остеоиндуктивны.

Ключевые слова: механотрансдукция; остеорегенерация; ММСК; остеодифференцировка; полиэфирэфиркетон; полиамид; гидроксиапатит; костно-пластический материал; щелочная фосфатаза; ализариновый красный.

Kopteva A., Gerasimova D.S., Minina A.S., Shupletsova V.V., Molokanova (Moskalyuk) O.A.

Viability and osteodifferentiation of MMSCs on 2.5D polymer scaffolds

I. Kant BFU, Kaliningrad, Russia

Abstract. Polyetheretherketone and polyamide are promising polymers for osteosubstitution that are not inferior in properties to metal constructs and do not have their disadvantages. *In vitro* studies used cultures of MMSCs of adipose tissue. We showed that the studied polymers do not affect the viability indices and are weakly osteoinductive.

Keywords: mechanotransduction; osteoregeneration; MMSC; osteodifferentiation; polyesteretherketone; polyamide; hydroxyapatite; bone plastic material; alkaline phosphatase; alizarin red.

Полиэфирэфиркетон (ПЭЭК) — популярный термопластичный материал, используемый в биомедицинской инженерии в качестве альтернативы титану с 1990 года. Такие преимущества ПЭЭК как модуль упругости, сопоставимый с модулем упругости нативной костной ткани, способность выдерживать несущую нагрузку, высокая химическая/биологическая стабильность, рентгенопрозрачные свойства, устойчивость к гидролизу и температурам сделали его привлекательным в качестве альтернативы титану и его сплавам. Однако молекулярная структура ПЭЭК делает его высокогидрофобным, что ограничивает применение ПЭЭК в ортопедии из-за его низкой интеграции с костными тканями [1], в связи с чем активно ведутся разработки стратегий по улучшению биоактивности/остеоинтеграции имплантатов ПЭЭК.

Классические полиамиды традиционно используются в медицине в качестве хирургических шовных нитей, протезов и ортопедических изделий. Одним из главных достоинств полиамидных соединений является эластичность и прочность, гипоаллергенность и биосовместимость [2], что делает их превосходной основой для создания гибридного композита.

Таким образом, целью данного исследования стала сравнительная оценка биоактивности композитных конструкций на основе ПЭЭК и ПА в чистом виде и наполненном гидроксиапатитом.

В данной работе использовались 2,5D-каркасы на основе ПЭЭК и ПА в неизменном виде и ПЭЭК/ПА, нагруженные гидроксиапатитом путем смешения в расплаве полимера.

В ходе 7, 14, 21 и 28 суток культивирования мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека (МСК жт) на полимерных подложках была подтверждена низкая способность ПЭЭК к индукции и поддержанию адгезии МСК, в том числе и ПЭЭК, нагруженного ГА. Аналогичная картина была отмечена для ПА и ПА/ГА. Иммуноферментный анализ щелочной фосфатазы (ЩФ) и окрашивание ализариновым

красным не показали значительного увеличения концентрации ЩФ, в сравнении с контролем. Увеличение синтеза щелочной фосфатазы относительно отрицательного контроля (культуры без образцов в стандартной питательной среде — 200 пг/мл), отмечено на 21 сутки (до 300 пг/мл), но уровень синтеза данного остеомаркера был значительно меньше этого показателя в культурах положительного контроля (культуры без образцов в остеодифференцировочной среде — более 1000 пг/мл), что свидетельствует о наличии незначительной динамики к остеоиндукции. Полученные данные обусловлены методом введения гидроксиапатита в структуру полимера и соответствуют физиологической норме выработки щелочной фосфатазы клетками стромы [3]. При окрашивании ализариновым красным так же не отмечено значительного увеличения отложений минерализованного матрикса в течение всего периода эксперимента, не зависимо от нагруженности полимера гидроксиапатитом.

Таким образом, отмечено что представленные в исследование полимерные материалы не оказывают острого цитотоксического эффекта на эукариотические клетки, не обладая при этом ярко выраженным механотрансдуктивным эффектом. Влияние ПЭЭК на индукцию остеодифференцировки, отсроченную цитотоксичность, способность материала к остеointegrации и сохранение механических свойств при пролонгированном контакте с имитированной жидкостью организма/ клетками требуют дальнейших исследований.

Список литературы

1. Briem D., Strametz S., Shrooder K., et al. Response of primary fibroblasts and osteoblasts to plasma treated polyetheretherketone (PEEK) surfaces // *J Mater Sci: Mater Med.* 2005. Vol. 16. P. 671–677. doi: 10.1007/s10856-005-2539-z
2. Qu W.P., Man Y., Li Y., et al. Preliminary biocompatible evaluation of nano-hydroxyapatite/polyamide 66 composite porous membrane // *Int J Nanomed.* 2010. Vol. 5. P. 429–435. doi: 10.2147/IJN.S10710
3. Vimalraj S. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization // *Gene.* 2020. Vol. 754. ID 144855. doi: 10.1016/j.gene.2020.144855

Копылова И.В.^{1,2} ✉, Казакова А.Н.¹, Грехнев Д.А.³, Скородумова Л.О.¹, Шендер В.О.^{1,4}, Арапиди Г.П.^{1,4,5},
Вигонт В.А.³, Богомазова А.Н.^{1,2}, Лагарькова М.А.¹, Лебедева О.С.^{1,2}

Митохондриальная ДНК как активатор нейровоспаления при болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2

¹ ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

⁵ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Россия

✉ ikopylova.msu@gmail.com

Аннотация. С помощью CRISPR/Cas9 мы создали набор ИПСК, отличающихся дозой мутантного аллеля G2019S-LRRK2, вызывающего болезнь Паркинсона. Мы дифференцировали эти ИПСК в нейроны, провели омиксные исследования, изучили поддержание гомеостаза кальция и активацию врожденного иммунного ответа в присутствии мтДНК.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; LRRK2; ИПСК; CRISPR/Cas9; дофаминергические нейроны; протеомные данные; мтДНК; кальций; врожденный иммунный ответ.

Kopylova I.V.^{1,2}, Kazakova A.N.¹, Grekhnev D.A.³, Skorodumova L.O.¹, Shender V.O.^{1,4}, Arapidi G.P.^{1,4,5},
Vigont V.A.³, Bogomazova A.N.^{1,2}, Lagarkova M.A.¹, Lebedeva O.S.^{1,2}

Mitochondrial DNA as an inducer of neuroinflammation associated with Parkinson's disease

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia;

³ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

⁵ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

Abstract. Using CRISPR/Cas9, we created a set of iPSCs differing in the dosage of G2019S LRRK2 mutant allele associated with Parkinson's disease. We differentiated these iPSCs into neurons, performed omics analyses, studied calcium homeostasis and activation of innate immune response in the presence of mtDNA.

Keywords: Parkinson's disease; LRRK2; iPSCs; CRISPR/Cas9; dopaminergic neurons; proteomics data; mtDNA; calcium; innate immune response.

Аминокислотная замена Gly2019Ser (G2019S) в киназе LRRK2 является одной из наиболее распространенных причин наследственных форм болезни Паркинсона (БП) — нейродегенеративного заболевания, которое на данный момент остается неизлечимым. Известно, что мутация G2019S приводит к усилению киназной активности LRRK2 [1]. С помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 нами были созданы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) с различными комбинациями аллелей: G2019S/G2019S, G2019S/wt, wt/wt, knockout (KO)/wt, KO/KO. Набор таких линий представляет полный спектр киназной активности LRRK2 от её максимума (G2019S/G2019S) до полного отсутствия (KO/KO).

Мы дифференцировали ИПСК в дофаминергические нейроны (ДАН), которые погибают при прогрессии БП. С помощью метода пэтч-кламп мы изучили депо-управляемый вход кальция в ДАН, а также провели протеомный анализ.

Мы наблюдали увеличение амплитуды депо-управляемого входа кальция в ДАН с гомозиготной и гетерозиготной мутацией G2019S. Результаты протеомного анализа указывали на корреляцию дозы мутантного аллеля LRRK2 с активацией врождённого иммунного ответа в ДАН. Мы предположили, что данный ответ в нейронах с G2019S может быть связан с высвобождением митохондриальной ДНК (мтДНК) из митохондрий с нарушенным балансом ионов кальция. Для проверки данной гипотезы мы измерили число копий мтДНК в ДАН и культуральной среде и обнаружили различия среди ДАН изогенной системы. Также, были выявлены отличия в активации врожденного иммунного ответа в присутствии мтДНК.

Таким образом, набор созданных изогенных линий ИПСК был использован для оценки роли мтДНК в активации врождённого иммунного ответа в ДАН на модели LRRK2-G2019S-ассоциированной БП.

Данная работа поддержана грантом № 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ.

Список литературы

1. Wang X., Negrou E., Maloney M.T., et al. Understanding LRRK2 kinase activity in preclinical models and human subjects through quantitative analysis of LRRK2 and pT73 Rab10 // *Sci Rep*. 2021. Vol. 11, N 1. ID 12900. doi: 10.1038/s41598-021-91943-4

Копылов Е.Д.¹ ✉, Пресняков Е.В.^{1,2}, Бозо И.Я.^{1,2}, Деев Р.В.³

Экспериментальное исследование влияния гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты с pDNA-VEGF на регенерацию кожи

¹ АО «Гистографт», Москва, Россия

² НКЦ № 2 РНЦХ имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

³ НИИ морфологии человека им. академика А.П. Авцына ГНЦ РФ ФГБНУ РНЦХ им. академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

✉ evgenijkopylov19540@gmail.com

Аннотация. Исследование оценивало влияние геля на основе гиалуроновой кислоты и фактора роста VEGF на заживление хронических ран у крыс с диабетом. Результаты показали, что гидрогель способствует заживлению, но планиметрические измерения не выявили значительных различий. Требуется дальнейшие исследования и оптимизация моделей.

Ключевые слова: регенерация кожи; гель на основе гиалуроновой кислоты; VEGF.

Kopylov E.D.¹, Presnyakov E.V.^{1,2}, Bozo I.Yu.^{1,2}, Deev R.V.³

Experimental study of the effect of hyaluronic acid-based hydrogel with pDNA-VEGF on skin regeneration

¹ Histograft JSC, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

³ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery"

Abstract. This study assessed the effects of a hyaluronic acid-based gel and the growth factor VEGF on chronic wound healing in diabetic rats. The results showed that the hydrogel promoted healing; however, planimetric measurements did not reveal significant differences. Further research and optimization of models are required.

Keywords: skin regeneration; hyaluronic acid-based gel; VEGF.

Введение. Длительно незаживающие, хронические, раны, включая пролежни, трофические и диабетические язвы, ожоги являются острой проблемой мирового здравоохранения. По разным оценкам, хроническими ранами на разных стадиях заживления страдают до 1–2% населения развивающихся стран [1]. Дефекты кожи и подлежащих тканей приводят к снижению продолжительности и качества жизни пациентов в виду потенциальных осложнений (болевого синдром, сепсис, ампутация конечности), увеличивает финансовые затраты на их лечение. Существующие методы консервативной терапии направлены на устранение причины заболевания, предотвращение инфицирования, купирование болевого синдрома и не обладают достаточной эффективностью. Ключевым компонентом эффективного заживления ран является васкуляризация. Кровеносные сосуды обеспечивают миграцию клеток иммунной системы и оксигенацию, способствуют пролиферации клеток соединительной ткани на стадии грануляции и эпителизации. Гиалуроновый гель ввиду ряда биологических свойств обеспечивает целостность кожи, достаточную гидратацию, а также служит матриksom для мигрирующих фибробластов и других клеток, участвующих в регенерации кожи [3]. Целью данной работы является оценка динамики заживления ран у крыс с индуцированным сахарным диабетом при топическом применении геля на основе гиалуроновой кислоты как отдельно, так и совместно с фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) в виде плазмидной ДНК (pDNA).

Материалы и методы. Исследование проводилось на 85 крысах породы «Wistar» весом 250–300 г. Сахарный диабет был смоделирован в соответствии с ранее опубликованным протоколом [2]. Вкратце,

для индукции сахарного диабета крысам была проведена внутривентральная инъекция раствора стрептозотцина (Streptozotocin, Sisco) в цитратном буфере (Citrate Buffer, Bioworld) в дозировке 65 мг/кг. Глюкометрия осуществлялась 1 раз в неделю в течение двух недель. Крысы с уровнем глюкозы венозной крови более 15 ммоль/л были введены в эксперимент. На спине были смоделированы экцизионные кожные дефекты на всю толщину кожи диаметром 25 мм с вовлечением *ranniculus carnosus*. Животным опытных групп ($n = 18$ каждая) ежедневно местно наносили гель/гель-VEGF в течение 7 дней. Крысы без гипергликемии (здоровые, $n = 18$) и с гипергликемией (СД, $n = 18$) служили контролем. Динамика заживления ран оценивалась на сроках 0, 3, 7, 14, 21 сутки путем планиметрии с применением программного обеспечения ImageJ. Статистические расчёты проводились с использованием языка программирования Python и пакетов *scipy*. Различия между группами оценивались с применением непараметрических критериев и поправкой на множественные сравнения.

Результаты. Формирование экцизионного дефекта на спине у грызунов является наиболее часто используемой моделью для изучения заживления ран и терапевтических средств. Непродолжительная гипергликемия не позволяет добиться отсроченных осложнений сахарного диабета, однако может оказывать влияние на длительность заживления ран [4]. После введения STZ летальность составила 11% (6/54 животных), что соответствовало данным протокола. Спустя 2 недели, гипергликемия была зарегистрирована у 72 из 79 (~91%). К 21 суткам у большинства животных во всех группах происходило закрытие кожного дефекта. Средняя площадь ран у животных без СД (здоровые) была статистически значимо меньше, чем у животных из других групп на сроках 3, 7 и 14 суток. На 0 и 21 сутках средняя площадь ран между группами не отличалась. При оценке протяженности дефекта на гистологических препаратах было выявлено, что размер раны в группе с СД был значимо выше, чем в остальных группах ($p < 0,05$), при этом отличий между группами гель/гель-VEGF и контролем не было установлено.

Заключение. Выявленные различия в размерах дефекта между группами опыта и СД при гистологическом исследовании позволяет предположить влияние гидрогеля на основе гиалуроновой кислоты/VEGF на заживление ран, однако эффект не был детектирован планиметрическим методом. Анатомо-физиологическое строение кожи и патофизиологические процессы регенерации у человека и грызунов значимо отличаются, поэтому ни одна из моделей не способна полностью отразить хронический процесс и динамику его развития. Влияние гидрогелевых материалов на скорость регенерации кожи может быть оценено путем оптимизации животной модели для получения более длительно заживающих дефектов, проведения дополнительных исследований и сравнения отсроченных эффектов.

Список литературы

1. Martinengo L., Olsson M., Bajpai R., et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies // *Ann Epidemiol.* 2019. Vol. 29. P. 8–15. doi: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005
2. Furman B.L. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats // *Curr Protoc.* 2021. doi:10.1002/cpz1.78
3. Antoszewska M., Sokolewicz E.M., Barańska-Rybak W. Wide use of hyaluronic acid in the process of wound healing — a rapid review // *Sci Pharm.* 2024. Vol. 92, N 2. ID 23. doi: 10.3390/scipharm92020023
4. Sami D.G., Heiba H.H., Abdellatif A. Wound healing models: A systematic review of animal and non-animal models // *Wound Med.* 2019. Vol. 24, N 1. P. 8–17. doi: 10.1016/j.wndm.2018.12.001

Корнилова Е.С.^{1,2}

Особенности регуляции ЭФР-рецепторной системы в культивируемых мезенхимных клетках человека

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ lenkor@incras.ru

Аннотация. Охарактеризован экспрессионный портрет ЭФР-рецепторной системы в МСК различного тканевого происхождения. Выявлены особенности функционирования рецептора ЭФР (с-ErbB1) в МСК на уровне эндоцитоза, транскрипции и трансляции рецепторов с-ErbB-семейства по сравнению с клетками опухолевого происхождения.

Ключевые слова: ЭФР-рецепторная система, мезенхимные стромальные клетки, клетки опухолевого происхождения, эндоцитоз, деградация, дифференцировка, транскрипция, трансляция.

Kornilova E.S.^{1,2}

Peculiarities of regulation of the EGF-receptor system in cultured human mesenchymal cells

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The expression portrait of EGF receptor system in MSCs of various tissue origins is characterized. The specificity of functioning of EGF receptor (с-ErbB1) in MSCs at the level of endocytosis, transcription and translation of с-ErbB receptors are revealed in comparison with cells of tumor origin.

Keywords: EGF receptor system; mesenchymal stromal cells; tumor cells; endocytosis; degradation; differentiation; transcription; translation.

К настоящему времени имеется много данных о вовлечении рецептора эпидермального фактора роста (Р-ЭФР) в регуляцию разных типов клеток, в том числе и мезенхимных стромальных (МСК), однако общая картина роли Р-ЭФР и механизмов ее реализации далека от понимания. ЭФР-рецепторная система состоит из четырех тирозинкиназных рецепторов — с-ErbB1 (Р-ЭФР), с-ErbB2 (HER2) и с-ErbB3 и с-ErbB4 и дюжины лигандов, специфичных как только для Р-ЭФР (ЭФР, ТФР- α , амфирегулин (АР)), так и способных связываться с несколькими членами семейства. Как показано для ряда клеточных линий, в основном опухолевого происхождения, как рецепторы, так и лиганды могут в различных соотношениях экспрессироваться в одних и тех же клетках. Для характеристики клеткок МСК различного тканевого происхождения (МСК эндометрия (энМСК2804 и АМО), МСК из пульпы зуба (МСК-DP) и МСК из вартонового студня) методом PCR-RT оценили уровень экспрессии с-ErbB и показали, что для ErbB1 и ErbB2 он так же высок, как в опухолевых клеточных линиях (HeLa, MCF7, A431, A549, SK-UT1B, SK-BR3), в то время как ErbB3 и ErbB4 практически отсутствуют. Кроме того, продемонстрировано, что ЭФР и ТФР- α , но не АР, стимулируют пролиферацию МСК, тогда как в клетках HeLa наблюдается обратная картина. Такой эффект может быть связан с различным набором ростовых факторов, синтезируемых самими клетками. На примере АР показано, что в МСК и в некоторых опухолевых линиях клеток наблюдается высокий уровень его мРНК, однако секреция свободного лиганда регистрируется только в эстроген-зависимых клетках. ЭФР и Р-ЭФР являются популярной моделью исследования рецептор-опосредованного эндоцитоза — события, стимулируемого при связывании лигандов с рецептором. Ранее мы показали, что эндоцитоз Р-ЭФР в МСК

отличается от традиционной схемы, реализуемой, в частности, в клетках HeLa, в соответствии с которой до 80–90% интернализированных ЭФР-рецепторных комплексов попадают в ранние EEA1-несущие эндосомы, что способствует формированию мультивезикулярных тел и дальнейшей доставке в лизосомы. Оказалось, что в МСК-DR и энМСК при действии ЭФР и ТФР- α формируется в несколько раз больше эндосом, причем в EEA1-зависимый цикл, приводящий к деградации через 2–4 часа, вступает лишь небольшая доля интернализированного Р-ЭФР, в то же время AP не стимулирует интернализацию. Основная часть Р-ЭФР оставалась в мелких эндосомах в течение длительного времени. Анализ деградации рецептора, определяемый по изменению уровня белка, показал, что ее динамика замедлена в энМСК по сравнению с HeLa, при этом в опухолевых клетках исходный уровень Р-ЭФР восстанавливался существенно быстрее, чем в энМСК. Предположили, что динамика и уровень закисления эндосом сразу после их формирования может влиять на длительность «окна EEA1-зависимых слияний», работающего при pH от 6,2 до 6,0. Действительно, используя разные протоколы подавления везикулярной H⁺-АТФ-азы с помощью Бафиломицина А1, мы показали, что практически полная нейтрализация эндоцитозного пути приводит к нарушениям слияний и разделений эндосомальных компартментов, но не блокирует транспорт Р-ЭФР. Однако при краткосрочном воздействии ингибитора на ранней стадии действия ЭФР, доля формируемых EEA1-позитивных эндосом возрастает, что свидетельствует в пользу более быстрого закисления эндосом в энМСК по сравнению с HeLa. Кроме того, аутофагия, в регуляции которой задействован ряд тех же комплексов, что и в регуляции канонического лизосомного пути, может конкурировать с ним на разных стадиях. В предварительных экспериментах обнаружено, что уровень маркера аутофагии LC3 может быть довольно высоким в энМСК. Еще одной причиной наблюдаемых различий между МСК и опухолевыми клетками может быть различная регуляция транскрипции и трансляции. Используя ингибиторный подход, мы обнаружили, что подавление транскрипции в HeLa приводило к снижению уровня Р-ЭФР даже в отсутствие лиганда, тогда как энМСК не отвечали на действие ингибитора, при этом интенсивность трансляции Р-ЭФР в МСК и в HeLa были сопоставимы. Также обнаружили, что при стимулированной дифференцировке энМСК увеличивали уровень экспрессии маркеров децидуализации пролактина и IGFBP1, при этом добавление ЭФР, ТФР- α и AP не вызывало изменения экспрессии маркеров на уровне РНК, но ЭФР и ТФР- α приводили к уменьшению количества IGFBP1 на уровне белка, что свидетельствует в пользу подавления трансляции. Обнаружено, что экспрессия Р-ЭФР существенно снижена в децидуализированных клетках в отличие от c-ErbB2, количество мРНК и белка которого оставались неизменными. В совокупности наши данные свидетельствуют о существовании отличий в регуляции ЭФР-рецепторной системы в МСК как на уровне эндоцитоза, так и транскрипции и трансляции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00335).

Коровина Д.Г.

Сравнение контактного и паракринного путей воздействия при миогенной дифференцировке мезенхимных стволовых/стромальных клеток животных

ФГБНУ «Федеральный научный центр — Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко РАН», Москва, Россия

✉ darya.korovina@gmail.com

Аннотация. Данное исследование описывает наиболее эффективные условия миогенной дифференцировки мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) крупного рогатого скота (КРС), выделенных из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ), при индукции с использованием линии клеток скелетной мышцы крысы L6J1.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые/стромальные клетки; костный мозг; жировая ткань; миогенная дифференцировка; кондиционированная среда; паракринные эффекты.

Korovina D.G.

Comparison of contact and paracrine pathways of influence during myogenic differentiation of animal mesenchymal stem/stromal cells

Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Centre VIEV”, Moscow, Russia

Abstract. This study describes the most efficient conditions for myogenic differentiation of bovine mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) isolated from bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) when induced using the rat skeletal muscle cell line L6J1.

Keywords: mesenchymal stem/stromal cells; bone marrow; adipose tissue; myogenic differentiation; conditioned medium; paracrine effects.

Для индукции МСК к миогенной дифференцировке необходимы специализированные среды или соответствующие методы культивирования. Тем не менее наиболее эффективные условия дифференцировки МСК в мышечные клетки еще не установлены. Для получения клеток мышечной ткани *in vitro* необходимы подходящие системы сокультивирования, которые обеспечивают инсулиноподобные факторы роста и стимулируют пролиферацию и дифференцировку миобластов. Согласно литературным данным, блокировка межклеточных контактов, ответственных за процессы слияния миобластов, может быть одним из перспективных подходов для усиления миогенного эффекта сокультивирования клеток L6J1 и МСК [1]. Клеточная линия L6J1 характеризуется одноядерной миобластоподобной морфологией со способностью к дифференцировке в многоядерные миотрубочки, а также синтезом мышечных сократительных белков. Поэтому представляло интерес оценить паракринные эффекты данной клеточной линии на МСК КРС с помощью межклеточного контакта без слияния клеток во время сокультивирования. Для этого обработанные митомицином С миобласты крысы L6J1 использовали качестве фидерных слоев для МСК. Клетки сокультивировали, используя ростовую среду для МСК, без применения дополнительных индукционных сред. Также в качестве индуктора для миодифференцировки МСК использовали среду, кондиционированную ростом миобластов линии L6J1, которые продуцируют молекулы метаболитов и факторы роста. Известно, что кондиционированная среда включает в себя модифицирующие субстрат компоненты, такие как фибронектин, коллаген, инсулиноподобные факторы роста (IGF-I, IGF-II), bFGF, PDGF, который является митогеном для клеток мезодермального

происхождения. Индукционная среда в этом случае состояла из кондиционированной и ростовой среды в соотношении 1:1. В связи с отсутствием специфических антител, миогенный потенциал МСК КРС оценивали на 28-е сут с помощью фазово-контрастной микроскопии и метода ПЦР-РВ для определения уровней экспрессии генов, которые являются поздним и ранним маркерами миогенеза (*MyoD1* и *MyoG* соответственно).

В результате проведенной индукции с использованием паракринных эффектов миобластов крысы L6J1 в группах МСК (ЖТ) происходило слияние миотрубочек в вытянутые волокна, содержащие множество клеток. МСК (КМ) также меняли свою морфологию и образовывали клеточные скопления. При этом дифференцировка в обеих культурах клеток сопровождалась экспрессией генов-маркеров клеток скелетной мышечной ткани. В группах МСК (ЖТ) выявлены наибольшие показатели экспрессии гена-маркера *MyoG* по сравнению с остальными экспериментальными группами. Отмечено, что в группах МСК (ЖТ) не было выявлено экспрессии гена *SM22a* и морфологически не наблюдалось появления клеток гладкой мышечной ткани. При этом, в группах МСК (КМ) при культивировании с добавлением кондиционированной среды продемонстрировано 1,3-кратное увеличение уровней экспрессии данного гена по сравнению с контролем. В экспериментальных группах МСК (КМ) и МСК (ЖТ), подвергнутых дифференцировке с применением фибринового слоя, был выявлен высокий уровень экспрессии гена-маркера раннего миогенеза (*MyoD1*), характерного для стадии образования миобластов. Таким образом, присутствие в среде для дифференцировки кондиционированной среды, полученной от миобластов крысы L6J1, стимулировало направленную дифференцировку МСК в мышечные клетки, причем эффективность ее индуцирующего действия была выше, что подтверждалось морфологически и результатами, полученными методом ПЦР-РВ.

Список литературы

1. Коровина Д.Г. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки сельскохозяйственных животных как перспективный источник для получения трехмерных аналогов мышечной ткани *in vitro*. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Дубровицы, 2020. 25 с.

Коротких А.Г.¹, Сазонов С.В.^{1,2}

Изменение уровней экспрессии Ki67 И NSE при репаративной регенерации миелиновых нервных волокон в периферическом нерве с использованием углеродных нанотрубок в модели *in vivo*

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

✉ korotkich.hist@yandex.ru

Аннотация. Пересечённый седалищный нерв кролика сшивали первичным хирургическим швом и накладывали кондуит из тefлонового сосудистого протеза, в полость которого помещали одностенные углеродные нанотрубки. Изготавливались полутонкие гистологические срезы, которые окрашивались ИГХ методом с использованием антител к Ki-67 и NSE. Проводился подсчёт процента пролиферирующих и NSE положительных клеток в проксимальном и дистальном отделах седалищного нерва опытных и контрольных конечностей.

Ключевые слова: регенерация; периферический нерв; одностенные углеродные нанотрубки; морфометрия; иммуногистохимия; Ki-67; NSE.

Korotkikh A.G.¹, Sazonov S.V.^{1,2}

Changes in Ki67 and NSE during reparative regeneration of myelin nerve fibers in the peripheral nerve using carbon nanotubes in an *in vivo* model

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Ural State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russia

² Institute of Medical Cell Technologies, Ekaterinburg, Russia

Abstract. The transected sciatic nerve of a rabbit was sutured with a primary surgical suture and a conduit made of a Teflon vascular prosthesis was applied, into the cavity of which single-wall carbon nanotubes were placed. Semi-thin histological sections were made, which were stained by the IHC method, antibodies to Ki-67 and NSE. The percentage of proliferating cells in the proximal and distal parts of the sciatic nerve of the experimental and control limbs was calculated.

Keywords: regeneration; peripheral nerve; single-wall carbon nanotubes; morphometry; immunohistochemistry; Ki-67; NSE.

При травмах периферических нервов сохраняется высокий процент инвалидизации и лишь небольшому числу пациентов удаётся восстановить функциональную активность повреждённого нерва [1]. Ранее нами было показано, что использование углеродных нанотрубок (УНТ) может стимулировать регенераторный процесс в поврежденном нерве с улучшением его функционирования [2]. Однако клеточный состав формирующегося регенерата после повреждения нерва был непонятен, гистологического исследования для определения фенотипа клеток оказалось недостаточно. Цель исследования — изучить возможные механизмы влияния одностенных углеродных нанотрубок на регенерацию миелиновых нервных волокон в периферическом нерве в экспериментальной модели *in vivo* с использованием возможностей иммуногистохимического метода исследования.

Материалы и методы. Моделью для оценки регенерации нерва являлись лабораторные кролики. Общее количество исследуемых животных составило 29 самцов, возрастом 6–7 месяцев и весом 4–5 кг.

Операцию проводили под общей анестезией. В качестве кондуита нерва использовался тефлоновый сосудистый протез, который накладывался в месте иссечённого участка седалищного нерва. В полость кондуита на опытной конечности помещались одностенные углеродные нанотрубки Carbonnanotube single-walled carboxylicacidfunctionalized (SWNT, Sigma-Aldrich, Германия). На контрольной конечности проводилась та же операция только без применения углеродных нанотрубок. Выход животных из эксперимента осуществляли через 6 месяцев. На гистологические срезы брали проксимальные и дистальные отделы нервного ствола, контрольной и опытной конечностей. Фиксацию гистологического материала осуществляли в 10% нейтральном формалине, время фиксации — 1 сутки. Изготавливали полутонкие гистологические срезы на микротоме Microm HM 340E (Германия). Антитела к нейронспецифической энолазе (NSE) — маркер нервных клеток (фермент, продуцирующийся в нейронах ЦНС и ПНС, а также клетках, имеющих нейральное происхождение) использовали для подтверждения нейральной природы клеток. NSE обычно экспрессируется в цитоплазме, но ее экспрессия повышается на клеточной мембране после клеточного повреждения, способствуя активации глиальных клеток [3]. Количественный метод оценки пролиферативной активности (процент клеток, участвующих в активном делении) использовали антитела к Ki-67. Экспрессия Ki-67 меняется в пределах всего клеточного цикла. Уровень белка считается низким в течении G1 и ранней S фазе, и возрастает до максимума к митозу. В анафазе и телофазе экспрессия Ki-67 значительно снижается. Таким образом, данный белок является точным маркером клеточной пролиферации [4]. ИГХ метод окраски с применением антител к NSE показал, что миелиновые оболочки нервных волокон окрашиваются в тёмно-коричневый цвет. Ядра соединительнотканых клеток, входящих в состав эндоневрия окрашиваются базофильно. При повреждении в образующемся регенерате периферического нерва появляется большое количество клеток, экспрессирующих NSE. По экспрессии этого маркера можно предположить, что пролиферирующими клетками являются нейролеммоциты. Ki-67 становится количественным показателем числа нейролеммоцитов, вступивших в пролиферацию [4, 5]. Подсчет числа клеток, экспрессирующих NSE выполнялся ручным методом, по методике “пишущей машинки” на микроскопе Olympus BX 43 (Япония) при увеличении 20×100 с использованием иммерсионного масла. Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием пакета «Statistica 6.0». При проверке статистической значимости результатов использовался уровень значимости не менее 0,95 ($p < A0,05$).

Результаты. Окрашивание антителами к NSE показало наличие значительного количества клеток нейральной природы (нейролеммоцитов) на срезах миелиновых нервных волокон в проксимальных и дистальных отделах нерва как контрольной, так и опытной конечности. При этом процент пролиферирующих клеток в проксимальном и дистальном участке нерва с использованием углеродных нанотрубок больше, по сравнению с таковыми в нерве контрольной конечности. Средняя доля числа пролиферирующих клеток в проксимальном участке опытной конечности $37,75 \pm 5,76$, а контрольной конечности $28,01 \pm 5,08$. В дистальном участке опытной конечности $44,13 \pm 5,21$, а контрольной конечности $27,33 \pm 5,08$.

Выводы:

1. С помощью метода иммуногистохимии показано, что клетки образующегося регенерата на месте поврежденного нерва и экспрессирующие NSE относятся к группе олигодендроглии — нейролеммоцитам.
2. Обнаружено достоверное увеличение числа пролиферирующих клеток, экспрессирующих NSE в регенерате опытной группе при использовании углеродных нанотрубок в кондуите нерва.
3. Установлено, что более быстрое и функционально полноценное восстановление периферического нерва после его повреждения связано со стимуляцией пролиферативных процессов в нейролеммоцитах.

Список литературы

1. Kunisaki A., Kodama A., Ishikawa M., et al. Carbon-nanotube yarns induce axonal regeneration in peripheral nerve defect // Sci Rep. 2021. Vol. 11, N 1. ID 19562. doi: 10.1038/s41598-023-48534-2
2. Коротких А.Г., Сазонов С.В., Тупоногов С.Н., Леонтьев С.Л. Влияние углеродных нанотрубок на строение миелиновых нервных волокон при резекции седалищного нерва // Вестник уральской медицинской академической науки. 2016. №1. С. 44–48. EDN: VYWUIJ

3. Iwanaga T., Takahashi Y., Fujita T. Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins // Arch Histol Cytol. 1989. Vol. 52, N S. P. 13–24. doi: 10.1109/IMNC.1989.4456220
4. Сазонов С.В. Определение уровня пролиферации в тканях органов при иммуногистохимическом исследовании Ki-67 // Морфология. 2018. Т. 153, № 3. С. 242. EDN: XZDBDF
5. Shen Y.-Y., Zhang R.-R., Liu Q.Y., et al. Robust temporal changes of cellular senescence and proliferation after sciatic nerve injury // Neural Regen Res. 2022. Vol. 17, N 7. P. 1588–1595. doi: 10.3324/haematol.2022.284041

Костандян Е.С.¹ ✉, Цырульников С.А.², Лукина Ю.С.³, Дятлов В.А.¹

Инъекционные костные пасты на основе полисахаридов для заполнения костных дефектов

¹ Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

² НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

³ НМИЦ травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова, Москва, Россия

✉ eva.kostandyan@yandex.ru

Аннотация. Инъекционные биоматериалы на основе природных полимеров привлекают особое внимание при проведении малоинвазивных методов реконструкции костных дефектов. Композиции на основе натуральных полимеров нетоксичны, биосовместимы, биodeградируемы и одобрены для использования в медицине.

Ключевые слова: инъекционные композиции; костная паста; полисахариды; карбоксиметилцеллюлоза.

Kostandyan E.S.¹, Tsurulnikov S.A.², Lukina Yu.S.³, Dyatlov V.A.¹

Polysaccharides based bone injectable pastes for bone defects filling

¹ Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

² N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

³ N.N. Priorov National Medical Research Center for Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia

Abstract. Injectable biomaterials based on natural polymers attract special attention when performing minimally invasive methods for reconstructing bone defects. Compositions based on natural polymers are non-toxic, biocompatible, biodegradable and approved for use in medicine.

Keywords: injectable systems; bone paste; polysaccharides; carboxymethylcellulose.

Использование трансплантируемых материалов для реконструкции костных дефектов часто ограничено в результате риска нежелательных иммунных реакций на инородное тело и возможности инфицирования после трансплантации. В связи с этим возрастает необходимость использования малоинвазивных способов лечения, которые оказываются менее травматичными в сравнении с аналогичными открытыми хирургическими вмешательствами. Для проведения таких процедур как правило используют различные инъекционные составы [1].

Одно из главных преимуществ инъекционных полимерных биоматериалов является возможность использования неинвазивных или малоинвазивных методов лечения. Помимо этого, они способны заполнять участки костных дефектов, которые имеют неправильную геометрию. В состав полимера могут быть включены биоактивные соединения или лекарства, что позволяет использовать их в качестве систем доставки терапевтических веществ, способных стимулировать регенерацию костной ткани.

Для создания костнозамещающих биоматериалов, предназначенных для введения в костный дефект, в настоящее время используются как натуральные, так и синтетические полимеры. Благодаря превосходной биосовместимости и биodeградируемости природные полимеры являются наиболее предпочтительными для создания на их основе биоматериалов для регенеративной медицины. Полисахариды являются биоактивными и обладают нативными функциональными возможностями для получения наиболее реакционноспособных производных и поэтому широко используются в клинической практике [2].

В настоящей работе была получена костная паста, состоящая из 40% вес. геля на основе окисленной карбоксиметилцеллюлозы с иммобилизованным антибиотиком и 60% вес. депротеинизированной крошкой (200–1000 мкм/1 см³). Композицию формировали путем добавления к полученному порошку деионизированной

воды до состояния пасты. Методами ИК-спектроскопии, MALDY-ToF масс-спектрометрии была исследована структура синтезированного геля. Остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства полученного материала исследовали в опытах *in vivo*. Полученный материал может быть использован в качестве остеопластического заменителя костного трансплантата, предназначенного для заполнения или реконструкции малых и средних костных дефектов.

Список литературы

1. Dreifke M.B., Ebraheim N.A., Jayasuriya A.C. Investigation of potential injectable polymeric biomaterials for bone regeneration // J Biomed Mat Res. 2013. Vol. 101A, N 8. P. 2436–2447. doi: 10.1002/jbm.a.34521
2. Ghandforoushan P., Alehosseini M., Golafshan N., et al. Injectable hydrogels for cartilage and bone tissue regeneration: A review // Int J Biol Macromol. 2023. Vol. 246. ID 125674. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.125674

Костоломова Е.Г.^{1,2} ✉, Полянских Е.Д.¹, Тимохина Т.Х.¹

Влияние супернатанта *Bifidobacterium bifidum* на синтез основных компонентов внеклеточного матрикса дермальными фибробластами в эксперименте *in vitro*

¹ ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России, Тюмень, Россия

² Университетский НИИ медицинских биотехнологий и биомедицины Тюменский ГМУ Минздрава России, Тюмень, Россия

✉ lenakost@mail.ru

Аннотация. Заживление ран является высокодинамичным процессом и включает в себя сложные взаимодействия молекул внеклеточного матрикса, растворимых медиаторов, различных резидентных клеток [1]. Ключевая роль в восстановлении дефектов в области раны принадлежит фибробластам [2, 3].

Ключевые слова: фибробласты; *Bifidobacterium bifidum*; цитокины; коллаген; эластин; проточная цитометрия.

Kostolomova E.G.^{1,2}, Polyanski E.D.¹, Timokhina T.Kh.¹

Influence of *Bifidobacterium bifidum* supernatant on the synthesis of the main components of the extracellular matrix by dermal fibroblasts in an *in vitro* experiment

¹ FSBEI HE Tyumen SMU of the Ministry of Health of Russian Federation, Tyumen, Russia

² The University SRI of medical biotechnology and biomedicine Tyumen SMU of the Ministry of Health of Russian Federation, Tyumen, Russia

Abstract. Wound healing is a highly dynamic process and involves complex interactions between extracellular matrix molecules, soluble mediators, and various resident cells [1]. Fibroblasts play a key role in the restoration of defects in the wound area [2, 3].

Keywords: fibroblasts; *Bifidobacterium bifidum*; cytokines; collagen; elastin; flow cytometry.

В настоящее время активно идет поиск экзогенных стимуляторов процессов репарации и регенерации. В последние десятилетия накоплены данные об иммуотропной активности бифидобактерий [4]. Ключевая же роль в восстановлении дефектов в области раны принадлежит фибробластам за счет секреции компонентов внеклеточного матрикса, метаболитов, сигнальных факторов для окружающих клеток и регуляции тканевого метаболизма. В работе приведены результаты исследования влияния супернатанта *Bifidobacterium bifidum* (10 мкл/мл) на морфофункциональные свойства фибробластов человека в динамике в эксперименте *in vitro*. Использовали эталонный штамм *Bifidobacterium bifidum* 791 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ «Генетика», № депонента АС-1247), использующийся при производстве пробиотика «Бифидумбактерин» (ЗАО «Экополис», г. Ковров) и фибробласты взрослого человека (линия клеток ЛЭЧ-4(81)) (лаборатория клеточных культур ЕНИИВИ, г. Екатеринбург). Структурно-функциональные исследования проводили на 1, 3, 7, 14, 21, 28 сутки сокультивирования. Продукты вторичного метаболизма *B. bifidum* оказывают стрессовое воздействие на морфофункциональное состояние фибробластов в первые сутки. Стимулируют процессы пролиферации в культуре в опыте $2,67 \pm 0,24$ в сравнении с контролем $0,75 \pm 0,15$ ($p < 0,01$), не блокируя при этом апоптоз в клетке. Это приводит к усилению продукции белков внеклеточного матрикса, как коллагена (пг/мл) (400 ± 19 против 110 ± 25 в контроле), так и эластина (нг/мл) (395 ± 30 и 125 ± 29). Максимальная адаптация клеток в опытной системе регистрируется на 7 сутки, что коррелирует с морфометрическим ($r = 0,59$) и цитометрическим ($r = 0,71$) исследованиями. Выявлено старение

культуры фибробластов, начиная с 21 суток культивирования, подтверждением чего является резкое увеличение концентрации растворимого рецептора CD 44 ($r = 0,88$), в отличие от контроля, которое подтверждается фенотипическими изменениями ($r = 0,66$). На 1 и 3 сутки наблюдается снижение CD105⁺, CD44⁺ рецепторов ($p < 0,05$), по сравнению с контрольной группой и увеличение экспрессии CD29⁺ ($p < 0,05$). Активированные фибробласты обладают измененным секреторным фенотипом, продуцирующим цитокины различной направленности TGF- β ($r = 0,78$), IL-6 ($r = 0,57$), IL-1 ($r = 0,75$), β IL-8 ($r = 0,63$). Максимальная адаптация клеток в опытной системе регистрируется на 7 сутки, что коррелирует с морфометрическим ($r = 0,59$) и цитометрическим ($r = 0,71$) исследованиями. Продукты вторичного метаболизма *B. bifidum* оказывают стрессовое воздействие на морфофункциональное состояние фибробластов в первые сутки сокультивирования. Они стимулируют процессы пролиферации, не блокируют апоптоз в клетке, что приводит к усилению продукции белков внеклеточного матрикса и цитокинов различной направленности, по всей видимости, потенцируя процессы репарации и регенерации ткани. Полученные данные способствуют пониманию механизмов иммунорегуляторного влияния нормобиоты (на модели бифидобактерий) на процессы репарации и регенерации. С учетом вышеизложенного, интерес к дальнейшим исследованиям свойствам пробиотических бактерий, очевиден.

Список литературы

1. Костоломова Е.Г., Стрелин С.А., Суховой Ю.Г., и др. Функция Т-лимфоцитов кожи человека в заживлении ран в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2023. Т. 26, № 2. С. 115–122. EDN: JBOKKO doi: 10.46235/1028-7221-12430-FOH
2. Марков А.А., Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., и др. Влияние супернатанта *Bifidobacterium bifidum* на морфофункциональные свойства фибробластов человека в динамике в эксперименте *in vitro* // Медицинская иммунология. 2023. Т. 25, № 3. С. 581–586. EDN: DTXGUV doi: 10.15789/1563-0625-EOB-2720
3. Koptuyug A., Sukhovei Y., Kostolomova E., et al. Novel strategy in searching for natural compounds with anti-aging and rejuvenating potential // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, N 9. ID 8020. doi: 10.3390/ijms24098020
4. Костоломова Е.Г., Тимохина Т.Х., Перунова Н.Б., и др. Оценка иммуномодулирующей активности *Bifidobacterium bifidum* 791 на модели клеток врожденного и адаптивного иммунитета в эксперименте *in vitro* // Российский иммунологический журнал. 2022. Т. 25, №2. С. 213–218. EDN: AJHYRM doi: 10.46235/1028-7221-1133-IVE

Косых А.В.^{1,2}, Жигмитова Е.Б.^{1,2}, Гурская Н.Г.^{1,2} ✉, Ребриков Д.В.^{1,2}

Доставка путем внутрикожной инъекции и транзientной трансфекции плазмиды, кодирующей коллаген 7 на модели мыши

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

² ФГАОУ РНИМУ имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

✉ ngurskaya@mail.ru

Аннотация. Рецессивный дистрофический буллезный эпидермолиз — тяжелая форма генодерматоза, связанная с нарушением в гене *COL7A1*. Предложен метод инъекций и транзientной трансфекции ДНК, кодирующей коллаген 7. Подбор условий инъекции и трансфекции проводится с помощью флуоресцентного белка.

Ключевые слова: рецессивный дистрофический врожденный буллезный эпидермолиз; генная терапия; коллаген 7; *COL7A1*; флуоресценция; мыши; транзientная трансфекция.

Kosykh A.V.^{1,2}, Zhigmitova E.B.^{1,2}, Gurskaya N.G.^{1,2}, Rebrikov D.V.^{1,2}

Delivery via intradermal injection and transient transfection of a plasmid encoding collagen 7 in a mouse model

¹ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after academician V.I. Kulakov, Ministry of Health, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health, Russia

Abstract. Recessive dystrophic epidermolysis bullosa is a severe form of genodermatosis associated with a mutation in the *COL7A1* gene. Method is proposed for injections and transient transfection of DNA encoding collagen 7. The conditions for injection and transfection are being optimized using a fluorescent protein.

Keywords: Epidermolysis bullosa; gene therapy; *COL7A1*; fluorescence; mice; transient transfection.

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это гетерогенная группа генодерматозов, в основе которой лежат мутации в генах, кодирующих структурные белки эпидермиса и дермо-эпидермального соединения. Отсутствие или снижение синтеза структурных белков приводит к нарушению взаимосвязи между эпидермисом и дермой, вследствие чего основным клиническим проявлением ВБЭ является образование пузырей и эрозий/язв [1]. При одной из форм ВБЭ — дистрофическом буллезном эпидермолизе (ДБЭ) — дефицит и дисфункция одного белка — коллагена 7 типа (C7) вызывает нарушение в прикрепляющих фибриллах, соединяющих дерму с эпидермисом. Рецессивная форма ДБЭ является наиболее тяжелым заболеванием, при котором возникают длительно незаживающие раны, на месте которых развивается быстрометастазирующий инвазивный плоскоклеточный рак кожи, помимо этого часто поражаются слизистые оболочки внутренних органов и нарушается зрение.

Применяемо в клиниках лечение ВБЭ является симптоматическим и направлено на предотвращение травматизации, образования пузырей/эрозий и сокращение сроков заживления язв и эрозий на коже.

Среди этиологических и патогенетических методов лечения выделяют белковую, клеточную и генную терапию [1]. Целью этих методов является восстановление синтеза коллагена 7 (C7) в области очагов поражения.

В основе заболевания лежат мутации — патологические варианты последовательности гена *COL7A1*. Тяжесть проявления заболевания зависит от типа мутации и ее локализации. Данный ген имеет в длину 31,132 пар оснований, что всего в три раза больше длины мРНК этого гена. Такая длина кодирующей части исключает возможность применения для генной терапии аденоассоциированных вирусов.

Было предпринято множество усилий по доклиническим исследованиям, посвященных проблеме доставки С7 в кожу при РДБЭ, включая прямую внутрикожную инъекцию лентивирусных векторов, экспрессирующих С7 [2]. Эти исследования показали, что доставка С7 временно снижает фенотип РДБЭ, но уровень экспрессии в тканях постепенно падал и при этом клетки сохраняли потенциально опасные интегрированные в геном копии ретровирусных регуляторных последовательностей.

В данной работе мы поставили цель разработать метод доставки коллагена 7 в кожу используя временную трансдукцию тканей. Преимуществом данной стратегии можно указать отсутствие прямого вмешательства в геном организма, а также относительно высокую стабильность коллагена 7 в тканях (не менее 2 месяцев).

Была проведена первичная оценка эффективности подхода на примере плазмиды, кодирующей флуоресцентный белок в дальне-красном спектре *Katushka* или *pTurboFP* (Евроген). Данная процедура позволила проверить метод введения ДНК, эффективность доставки и отследить время получения сигнала от экспрессии по накоплению флуоресценции. Плазмида *pIK* совместно с трансфекционным агентом (ТА) была инъецирована подкожно мышам линии *C57Bl6* в участок кожи размером 1см^2 по 20 мкл в 5 точек, суммарный объем введения составил 100 мкл. Далее каждый день проводили забор материала для последующего создания криосрезов кожи для детекции флуоресценции в течение 7 суток. Показано, что с 3 суток и до 7 (последняя точка наблюдения) в тканях кожи детектируется сигнал в дальне красной области спектра, подтверждающий наработку белка тканями реципиента. Также отметили отсутствие выраженной реакции иммунной системы на вводимый конструктор. Плазмида, кодирующая коллаген 7 под контролем *CMV* промотора, имеет размер около 12 тысяч пар оснований. Данная ДНК также была трансфицирована экспериментальным животным по разработанной схеме. Анализ криосрезов на наличие экспрессии проводится с помощью иммуногистохимического анализа со специфическими антителами к коллагену 7 человека.

Данное направление в работе станет основой для дальнейшего развития и подбора генно-терапевтического подхода к терапии ДБЭ у пациентов.

Работа поддержана грантом Министерства здравоохранения РФ № 123020800102-9.

Список литературы

1. Has C., Bauer J., Bodemer C., et al. Consensus reclassification of inherited epidermolysis bullosa and other disorders with skin fragility // *Br J Dermatol.* 2020. Vol. 183, N 4. P. 614–627. doi: 10.1111/bjd.18921
2. Woodley D.T., Keene D.R., Atha T., et al. Intradermal injection of lentiviral vectors corrects regenerated human dystrophic epidermolysis bullosa skin tissue *in vivo* // *Mol Ther.* 2004. Vol. 10, N 2. P. 318–326. doi: 10.1016/j.yimthe.2004.05.016

Котенева П.И.¹✉, Бикмулина П.Ю.¹, Ефремов Ю.М.¹, Кошелева Н.В.¹, Шпичка А.И.¹, Тимашев П.С.^{1,2}

Биофабрикация биоэквивалентов уретры из сфероидов буккального эпителия и мезенхимных стромальных клеток (МСК)

¹ Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

² Научный центр мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение», Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ koteneva.polina@yandex.ru

Аннотация. Были созданы двуслойные биоэквиваленты уретры из эпителиальных и мезенхимных сфероидов методом экструзионной 3D-биопечати. Эпителиальные сфероиды образовывали плотный слой в верхней части конструктора, тогда как мезенхимные сфероиды формировали плотную основу.

Ключевые слова: сфероиды; 3D-биопечать; биофабрикация; буккальный эпителий; МСК; биоэквивалент.

Koteneva P.¹, Bikmulina P.¹, Efremov Yu.¹, Kosheleva N.¹, Shpichka A.¹, Timashev P.^{1,2}

Biofabrication of urethral equivalents from spheroids of the buccal epithelium and mesenchymal stromal cells (MSCs)

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. Bilayered bioequivalents of the urethra were created using epithelial and mesenchymal spheroids through extrusion-based 3D bioprinting. The epithelial spheroids formed a dense layer at the upper part of the construct, while the mesenchymal spheroids established a solid foundation.

Keywords: spheroids; 3D-bioprinting; biofabrication; buccal epithelium; MSC; bioequivalent.

За счет трехмерного комплекса взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом, градиентов питательных веществ и кислорода [1]. 3D-клеточные сфероиды являются универсальными строительными блоками для биофабрикации эквивалентов тканей и органов, в том числе с помощью метода биопечати [2]. Структура сфероидов позволяют сохранить жизнеспособность клеток в процессе биопечати за счет снижения стресса в 3D-структуре. Подходы биофабрикации позволяют формировать ткани, комбинируя строительные блоки из различных типов клеток, формируя стандартизованные биоэквиваленты со структурой, более приближенной к нативным тканям. Первичные культуры клеток, выделенные из тканей человека, являются перспективным материалом для фабрикации биоэквивалентов за счет возможности применения персонализированных технологий для каждого пациента. Структура протяженных органов мочеполовой системы является распространенным заболеванием в урологии, причиняющим значительный дискомфорт пациентам. Инновационные методы с использованием тканеинженерных конструкторов могут стать эффективным средством лечения наряду с традиционными методами буккальной уретропластики. Для биофабрикации эквивалента уретры важна комбинация многослойного эпителия и стромы. Целью данной работы стало создание двуслойных биоэквивалентов методом экструзионной 3D-биопечати из эпителиальных и мезенхимных сфероидов.

Материалы и методы. Буккальный эпителий и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) выделяли из эксплантатов оболочки ротовой полости и свободной десны человека, характеризовали с применением проточной цитометрии. Сфероиды формировали с помощью агарозных планшетов 3D Petri Dish (MicroTissue, США). Биоэквиваленты были созданы с помощью экструзионного 3D-биопринтера CELLINK

BioX (CELLINK, Швеция) с помощью биочернил на основе фибринового гидрогеля и желатина по протоколу, описанному ранее [3].

Результаты. Были выделены и охарактеризованы первичные культуры буккального эпителия и мезенхимных стромальных клеток. Мезенхимные стромальные клетки имели классическую веретеновидную морфологию и по результатам проточной цитометрии экспрессировали все необходимые положительные маркеры [4]. Клетки буккального эпителия на первых пассажах имели полигональную морфологию, но в ходе культивирования проходили эпителио-мезенхимный переход и приобретали веретеновидную форму. Созданные из выделенных культур сфероиды были жизнеспособны и к 7 суткам компактизовались на 47,6 и 40,7% соответственно. Сфероиды, собранные из клеток буккального эпителия, экспрессировали маркеры как эпителиального (ZO-1, цитокератин), так и мезенхимного (фибронектин, виментин) фенотипа клеток, сфероиды МСК экспрессировали маркеры мезенхимного фенотипа. По результатам измерения механических свойств сфероиды из МСК были в 2,2 раза мягче сфероидов из буккального эпителия и реактивировали на культуральном пластике в 2,3 раза быстрее. Эпителиальные сфероиды реактивировали преимущественно единым фронтом клеток и на меньшие расстояния, тогда как МСК распространялись на более дальние расстояния за счет миграции единичных клеток. Были успешно сформированы двуслойные биоэквиваленты из эпителиальных и мезенхимных клеток с помощью биочернил на основе фибрина и желатина. Для создания эпителиального слоя были опробованы протоколы биопечати как суспензией, так и сфероидами. При печати биочернилами с суспензией эпителиальных клеток в конструктах сразу после печати обнаруживали мертвые клетки в большом количестве, и к 7 суткам формирования эпителиального слоя происходило на 24,1%. При печати сфероидами из буккального эпителия также было замечено, что поверхностная зона агрегатов была повреждена и состояла из мертвых клеток, однако сфероиды сохраняли жизнеспособное ядро. В процессе созревания эквивалента плотный эпителиальный слой формировался за счет распространения жизнеспособных сфероидов в верхней части конструкта, тогда как мезенхимные сфероиды формировали разветвленную сеть клеток, создавая плотную основу в нижней части конструкта.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 23-15-00481).

Список литературы

1. Cui X., Hartanto Y., Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation // J Royal Soc. 2017. Vol. 14, N 127. ID 20160877. doi: 10.1098/rsif.2016.0877
2. Mironov V., Visconti R.P., Kasyanov V., et al. Organ printing: tissue spheroids as building blocks // Biomaterials. 2009. Vol. 30, N 12. P. 2164–2174. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.12.084
3. Bikmulina P., Kosheleva N., Efremov Y., et al. Building a tissue: Gingiva- and adipose-derived mesenchymal cell spheroids' survivability and functionality after 3D extrusion bioprinting. Building a Tissue. New York, Rochester, 2022. 30 p. doi: 10.2139/ssrn.4266765
4. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy. 2006. Vol. 8, N 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

Котов М.А.^{1,2} ✉, Каменцева Р.С.¹, Харченко М.В.¹, Кошеверова В.В.¹, Корнилова Е.С.^{1,3}

Влияние синтеза *de novo* на регуляцию уровня рецептора эпидермального фактора роста (рЭФР) при ЭФР-опосредованной стимуляции в мезенхимных стромальных клетках человека

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Институт биомедицинских систем и биотехнологий, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

✉ happyhmalich@yandex.ru

Аннотация. С использованием ингибиторов транскрипции и трансляции показано, что в энМСК лиганд-опосредованное снижение уровня рецептора ЭФР компенсируется за счёт его трансляции.

Ключевые слова: рецептор ЭФР; деградация; *de novo* синтез; энМСК; HeLa; ингибиторный анализ.

Kotov M.A.^{1,2}, Kamentseva R.S.¹, Kharchenko M.V.¹, Kosheverova V.V.¹, Kornilova E.S.^{1,3}

The effect of *de novo* synthesis on the regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) levels during EGF-mediated stimulation in human mesenchymal stromal cells

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Institute of Biomedical Systems and Biotechnologies, Saint Petersburg, Russia

³ Faculty of Biology, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Using transcription and translation inhibitors, it was shown that in enMSCs, ligand-mediated reduction in the level of the EGF receptor is compensated by its translation.

Keywords: EGF receptor; *de novo* degradation; *de novo* synthesis; enMSC; HeLa; inhibitory analysis.

Одним из крайне неблагоприятных маркеров злокачественных клеток является повышенный уровень экспрессии эпидермального фактора роста (рЭФР) [1]. В ходе предыдущих исследований нами было показано, что в ряде мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека, включая МСК эндометрия (энМСК), уровень рЭФР не уступает известным линиям клеток опухолевого происхождения, гиперэкспрессирующим рЭФР [2]. При этом МСК рассматриваются в качестве модели нормальных клеток. Динамика ЭФР-опосредованной лизосомальной деградации рЭФР в энМСК была замедлена по сравнению с трансформированными клетками HeLa, а остаточный уровень рЭФР оставался низким в течение длительного времени.

Целью данной работы было оценить влияние ЭФР-опосредованной деградации, а также синтеза мРНК и белка рЭФР *de novo* на регуляцию количества рецептора ЭФР в энМСК и опухолевых клетках человека.

Мы показали, что в HeLa и энМСК при добавлении ЭФР количество рецептора ЭФР уменьшается в четыре раза в течение суток. В отличие от энМСК, в клетках HeLa происходит восстановление уровня рецептора ЭФР уже на пятые сутки.

Вклад синтеза *de novo* в уровень рецептора ЭФР исследовали двух уровнях: транскрипции (с использованием ингибитора актиномина Д) и трансляции (подавляемой с помощью циклогексимида). В присутствии актиномина Д в клетках HeLa уровень рЭФР снижался, что свидетельствует об интенсивном обороте рЭФР даже в отсутствие лиганда. В энМСК подобной картины не наблюдалось. Однако высокая

токсичность актиномицина Д не позволяет интерпретировать полученные результаты уверенно, из-за смерти клеток до наступления периода восстановления.

В присутствии циклогексимида количество рЭФР в обеих клеточных линиях также падало ко вторым суткам инкубации с ингибитором в 3–4 раза, что указывает на сопоставимую интенсивность трансляции рецептора ЭФР. При этом в обеих клеточных линиях восстановление уровня рецептора ЭФР после инкубации с ЭФР блокируется циклогексимидом: лиганд-опосредованная деградация рЭФР в присутствии ингибитора приводит к практически полному исчезновению рЭФР ко вторым суткам.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00335).

Список литературы

1. Saadeh F.S., Mahfouz R., Assi H.I. EGFR as a clinical marker in glioblastomas and other gliomas // *Int J Biol Markers*. 2018. Vol. 33, N 1. P. 22–32. doi: 10.5301/ijbm.5000301
2. Kamentseva R.S., Kharchenko M.V., Gabdrahmanova G.V., et al. EGF, TGF- α and amphiregulin differently regulate endometrium-derived mesenchymal stromal/stem cells // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 17. ID 13408. doi: 10.3390/ijms241713408

Кошеверова В.В.¹, Каменцева Р.С.¹, Харченко М.В.¹, Шварц А.П.², Корнилова Е.С.^{1,3}

ЭФР-рецепторная система в мезенхимных стромальных клетках человека: экспрессия рецепторов семейства ErbB и влияние лигандов рецептора ЭФР на пролиферацию клеток

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

✉ vera77867@mail.ru

Аннотация. Оценили экспрессию рецепторов семейства ErbB в мезенхимных стромальных клетках человека (МСК) из разных тканей и влияние лигандов ErbB1 на их пролиферацию. Показали, что в МСК наблюдается высокий уровень экспрессии ErbB1 и ErbB2, но не ErbB3 и ErbB4. ЭФР и TGF α стимулируют пролиферацию МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки человека; семейство ErbB рецепторов; рецептор эпидермального фактора роста; пролиферация; тирфостин.

Kosheverova V.V.¹, Kamentseva R.S.¹, Kharchenko M.V.¹, Schwarz A.P.², Kornilova E.S.^{1,3}

EGF-receptor system in the human mesenchymal stromal cells: expression of RrbB family receptors and the influence of EGF receptor ligands on cell proliferation

Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The expression of ErbB receptors in human mesenchymal stromal cells (MSCs) from different tissues and the role of ErbB1 ligands in their proliferation were evaluated. We have found that MSCs possess high levels of ErbB1 and ErbB2, but not ErbB3 and ErbB4. EGF and TGF α stimulate MSCs proliferation.

Keywords: human mesenchymal stromal cells; the ErbB receptor family; epidermal growth factor receptor; proliferation; tyrphostin.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) обладают большим потенциалом для использования в регенеративной медицине благодаря наличию способности к дифференцировке в нескольких направлениях, секреции биологически активных веществ (факторов роста и цитокинов), а также благодаря относительной легкости их выделения из тканей в том числе взрослого организма, что дополнительно способствует разработке способов их использования для персонализированной медицины. Использование МСК в регенеративной медицине подразумевает необходимость быстрого наращивания большого числа клеток. В литературе имеются данные об участии Wnt-сигнального пути и ряда ростовых факторов (VEGF, FGF, TGF β) в регуляции пролиферации МСК [1, 2], хотя точные механизмы и пути, задействованные в этом процессе, остаются неизвестными. Семейство ErbB тирозин-киназных рецепторов и их лиганды, компоненты т.н. ЭФР-рецепторной системы, являются одной из основных универсальных систем, регулирующих пролиферацию клеток. Однако в настоящее время в литературе мало данных о том, какие компоненты ЭФР-рецепторной системы экспрессируются в МСК различного происхождения и как влияют на функционирование этих клеток. В связи с этим в настоящей работе мы оценили экспрессию всех четырех рецепторов

семейства ErbB в двух линиях эндометриальных МСК (энМСК2804 и АМО), МСК из пульпы зуба (МСК-DP) и МСК из вартонового студня с помощью метода полуколичественного ПЦР в реальном времени. В качестве референсных линий для оценки уровня экспрессии генов мы использовали ряд линий опухолевых клеток с известным уровнем экспрессии компонентов ЭФР-рецепторной системы (HeLa, MCF7, A431, A549, SK-UT1B, SK-BR3). Оказалось, что все использованные в работе МСК схожи между собой по профилю экспрессии ErbB рецепторов. Так, МСК экспрессируют рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР или ErbB1) и ErbB2, причем уровень их экспрессии сравним с таковым с опухолевыми клетками HeLa (для РЭФР) и HeLa, MCF7, SK-UT1B и A431 (для ErbB2). В то же время мы показали, что экспрессия рецепторов ErbB3 и ErbB4 в исследованных нами МСК минимальная или полностью отсутствует. С помощью ДСН-ПААГ электрофореза с последующим иммуноблоттингом нами было обнаружено, что уровень белка РЭФР в тотальных лизатах клеток МСК также сравним с таковым в малигнизированных клетках. Значительный уровень РЭФР и ErbB2 в МСК предполагает, что ЭФР-рецепторная система играет важную роль в функционировании этих клеток. Чтобы это проверить, мы оценили влияние лигандов РЭФР эпидермального фактора роста (ЭФР) и трансформирующего фактора роста- α (TGF α) на пролиферацию МСК. Для этого эндометриальные МСК (энМСК) линии 2804 и МСК из вартонового студня высевали на чашки Петри и на следующий день среду заменяли полной культуральной средой, содержащей один из лигандов. После добавления лигандов через 1–5 сут с помощью проточного цитометра подсчитывали количество клеток. Оказалось, что добавление ЭФР и TGF α приводило к увеличению числа энМСК на 5-е сутки. Добавление ЭФР также стимулировало пролиферацию МСК, выделенных из вартонового студня, что приводило к повышению их количества на 2-е сутки. Чтобы оценить, насколько наблюдаемый нами митогенный эффект связан с тирозинкиназной активностью РЭФР, клетки энМСК обрабатывали ингибитором тирозинкиназы РЭФР тирфостином AG-1478. Мы обнаружили, что тирфостин отменял ЭФР- и ТФР- α -зависимое усиление пролиферации энМСК, не влияя при этом на количество клеток в контроле (без добавления лиганда). Таким образом, мы показали, что в МСК различного происхождения наблюдается высокий уровень экспрессии рецепторов РЭФР и ErbB2, сравнимый с таковым в малигнизированных линиях клеток, а лиганды РЭФР ЭФР и TGF α стимулируют пролиферацию энМСК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00335.

Список литературы

1. Rodrigues M., Griffith L.G., Wells A. Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells // *Stem Cell Res Ther.* 2010. Vol. 1. ID 32. doi: 10.1186/scrt32
2. de Araújo Farias V., Carrillo-Gálvez A.B., Martin F., Anderson P. TGF- β and mesenchymal stromal cells in regenerative medicine, autoimmunity and cancer // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2018. Vol. 43. P. 25–37. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.06.002

Кошелева Н.В.✉, Пешкова М.А., Корнеев А.А., Ревокатова Д.П., Власова И.И., Ключев Т.О., Шпичка А.И., Тимашев П.С.

Секретом мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека в условиях 2D- и 3D-культур

Институт регенеративной медицины Научно-технологического парка биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

✉ kosheleva_n_v@staff.sechenov.ru

Аннотация. Состав и соотношение секретируемых МСК цитокинов и хемокинов зависят от источника клеток и способа их культивирования. МСК основного вещества пупочного канатика в 3D-культуре, в виде сфероидов, перспективны для терапии воспалительных заболеваний и для стимуляции регенерации.

Ключевые слова: секретом; кондиционированная среда; цитокины и хемокины; мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки; 3D-культура; сфероиды.

Kosheleva N.V., Peshkova M.A., Korneev A.A., Revokatova D.P., Vlasova I.I., Klyucherev T.O., Shpichka A.I., Timashev P.S.

Secretome Characteristics of Human Mesenchymal STEM/Stromal Cells in 2D and 3D Culture Conditions

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. The composition and ratio of MSC's secreted cytokines and chemokines depend on the source of the cells and culture conditions. MSCs derived from the umbilical cord Wharton's jelly in 3D culture, in the form of spheroids, are promising for the therapy of inflammatory diseases and for stimulating regeneration.

Keywords: secretome; conditioned media; cytokines and chemokines; multipotent mesenchymal stem/stromal cells; 3D culture; spheroids.

Мультипотентные мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) и продукты на их основе широко применяют в регенеративной медицине при различных патологических состояниях благодаря их широкому дифференцировочному потенциалу, выраженным паракринным иммуномодулирующим и прорегенеративным эффектам и широкому спектру источников получения [1]. Есть данные, свидетельствующие о влиянии микроокружения, источника ткани, из которой получены клетки и условий культивирования на эффективность терапии с применением МСК [2]. Цель данной работы — сравнительный анализ секретома МСК человека, полученных из различных источников и при различных условиях культивирования.

МСК были изолированы из различных источников: костного мозга, подкожной жировой ткани, слизистой оболочки ротовой полости, плаценты и основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК). Клетки культивировали в стандартных условиях — 37°C, 5% CO₂, для экспериментов использовали культуры 4-ого пассажа. МСК культивировали либо в виде монослоев (2D), либо в виде сфероидов (3D). Анализировали иммунофенотип, а также потенциал к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировкам. Кондиционированные среды получали из 2D- и 3D-условий культивирования от 2,5×10⁵ кл/мл. Экспрессию цитокинов и хемокинов анализировали с применением технологии мультиплексного анализа xMAP (Luminex, США). Макрофаги изолировали из моноцитов периферической крови человека, влияние кондиционированных МСК сред на их поляризацию оценивали через 48 ч с применением ИФА.

МСК из различных источников экспрессировали классические мезенхимные маркеры (CD105, CD73, CD90, CD44) и демонстрировали способности к остеогенной, хондрогенной и адипогенной дифференцировкам.

Были выявлены различия профилей экспрессии цитокинов и хемокинов в кондиционированных МСК из различных источников средах при различных условиях культивирования. Так, наибольшей паракринной активностью обладали МСК-ПК, концентрации IL-8, GRO, IL-6, MCP-1, G-CSF, превышали 1 нг/мл. Более того, сравнение между 2D- и 3D-культурами МСК-ПК выявило большие уровни экспрессии цитокинов и хемокинов 3D-культурах. При преобладании провоспалительных цитокинов секретом МСК-ПК от 2D- и 3D-культур стимулировал поляризацию макрофагов в противовоспалительный M2 фенотип с активацией экспрессии их маркера CD206 и подавлением экспрессии TNF- α , маркирующего M1 макрофаги. Полученные результаты подчеркивают влияние как источника, так и условий культивирования на паракринную активность МСК.

Наблюдаемые различия в экспрессии цитокинов и хемокинов подчеркивают необходимость оптимизации условий культивирования при разработке терапевтических агентов на основе МСК. Секретом МСК-ПК, особенно из 3D-культур, представляет собой перспективный источник цитокинов и хемокинов с потенциальными применениями в терапии воспалительных заболеваний и для стимуляции регенерации. Необходимы дальнейшие исследования для изучения механизмов, лежащих в основе установленных различий паракринной активности, и их терапевтических эффектов для расширения терапевтического потенциала применения и разработки новых продуктов на основе МСК.

Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», реализуемой на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Список литературы

1. Maldonado V.V., Patel N.H., Smith E.E., et al. Clinical utility of mesenchymal stem/stromal cells in regenerative medicine and cellular therapy // *J Biol Eng*. 2023. Vol. 17, N 1. ID 44. doi: 10.1186/s13036-023-00361-9
2. Liu J., Gao J., Liang Z., et al. Mesenchymal stem cells and their microenvironment // *Stem Cell Res Ther*. 2022. Vol. 13, N 1. ID 429. doi: 10.1186/s13287-022-02985-y

Кравченко С.В.^{1,2} ✉, Трофименко А.И.^{1,3,4}, Сухно И.В.²

Опыт настройки экструзионного биопринтера для формирования паттернов из дискретных капель

¹ Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия

² Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, Краснодар, Россия

³ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

⁴ НИИ Краевая клиническая больница № 1 им. проф. С.В. Очаповского Минздрава Краснодарского края, Краснодар, Россия

✉ ksv.1991@yandex.ru

Аннотация. Целью данной работы явился подбор настроек для печати экструзионным биопринтером паттерна в виде дискретных капель. Результаты актуальны для высокоточного нанесения биоматериалов и биологически активных веществ при создании сложных тканеподобных структур и модельных систем типа «орган-на-чипе».

Ключевые слова: биопечать; биопринтер; экструзионная биопечать; биопечать дискретными каплями; G-код; «орган-на-чипе».

Kravchenko S.V.^{1,2}, Trofimenko A.I.^{1,3,4}, Sukhno I.V.²

Thermal imaging of the performance of a cooled platform for extrusion bioprinting with thermoreversible hydrogels

¹ Kuban State Technological University, Krasnodar, Russia

² Kuban State Agrarian University named after I.T. Trubilin, Krasnodar, Russia

³ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

⁴ Ochapovsky Regional Clinical Hospital no. 1, Krasnodar, Russia

Abstract. The aim of this work was to select settings of extrusion bioprinter for printing the discrete drops pattern. The results are relevant for high-precision dispensing of biomaterials and biologically active substances when creating complex tissue-like structures and model systems such as “organ-on-a-chip”.

Keywords: bioprinting; bioprinter; extrusion bioprinting; discrete droplets bioprinting; G-code; organ-on-chip.

В основе экструзионной биопечати лежит подача биочернил непрерывным потоком через сопло при помощи давления, создаваемого поршнем, сжатым воздухом или работой шнекового механизма. Именно непрерывный характер подачи материала обеспечивает большую структурную целостность получаемых данным методом тканеинженерных конструкций относительно струйной и лазерной техники биопечати [1]. Благодаря оптимальному сочетанию различных характеристик, именно экструзионная биопечать является наиболее широко распространенной техникой [2], из чего следует, организаций или лаборатория, занимающаяся вопросами биопечати, с наибольшей вероятностью будет иметь в своем распоряжении биопринтер именно экструзионного типа, нежели лазерного или струйного. При этом, во многих исследованиях может требоваться не только непрерывная потоковая подача биоматериала, но и его дозирование в виде дискретных капель для нанесения биоматериалов, клеток и биологически активных веществ в виде различных паттернов.

Целью данной работы явился подбор настроек для печати экструзионным биопринтером паттерна в виде дискретных капель.

Использовался экструзионный биопринтер собственной разработки, имеющий подвижную по осям Y и Z печатающую головку и платформу, подвижную по оси X. Экструзионная система поршневого типа

(шприцевой насос). Размер канюли сопла — 20G. Для управления работой биопринтера использовалось программное обеспечение UltiMaker Cura версии 5.2.2 со специально разработанным профилем для биопринтера. Был написан G-код, согласно которому на поверхность дна чашки Петри наносился массив 6×6 капель диаметром 1 мм каждая. Расстояние между центром соседних капель по горизонтали и по вертикали составляет 4 мм. Работа биопринтера по описанному в данном G-коде алгоритму тестировалась на дистиллированной воде, поскольку, в отличие от вязких биочернил, ряд веществ, которые могут быть нанесены таким способом в рамках эксперимента, представляют собой ньютоновскую жидкость, либо просто, обладают текучестью, гораздо более высокой, чем у гидрогелей, обычно используемых в качестве биочернил. Биопринтер, работающий согласно подобранным в рамках данной работы настройкам с написанным для получения паттернов из дискретных капель демонстрирует высокую точность — все капли в массиве одинакового размера, не наблюдается существенных смещений капель по вертикали и по горизонтали относительно заданных g-кодом координат. Полученные результаты могут применяться для высокоточного нанесения различных биоматериалов и биологически активных веществ при создании сложных тканеподобных структур и модельных систем типа «орган-на-чипе».

Список литературы

1. Pati F., Jang J., Lee J.W., Cho D.W. Chapter 7 – Extrusion bioprinting. В кн.: Atala A., Yoo J.J., editors. Essentials of 3D biofabrication and translation. Academic Press, 2015. P. 123–152. doi: 10.1016/B978-0-12-800972-7.00007-4
2. Ramesh S., Harrysson O.L., Rao P.K., et al. Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities // Bioprinting. 2021. Vol. 21. ID e00116. doi: 10.1016/j.bprint.2020.e00116

Красковская Н.А.✉, Парфенова П.С., Булычев М.А., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.

Разработка новой персонализированной модели болезни Хантингтона

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ ninakraskovskaya@gmail.com

Аннотация. Для разработки пациент-специфичной модели болезни Хантингтона применялась транс-дифференцировка дермальных фибробластов в индуцированные нейроны стриатума. Новая модель может применяться для изучения патогенеза заболевания, а также для индивидуальной оценки прогрессирования патологии у пациентов.

Ключевые слова: болезнь Хантингтона; фибробласты; индуцированные нейроны; прямое перепрограммирование.

Kraskovskaya N.A., Parfenova P.S., Bulychev M.A., Khotin M.G., Mikhailova N.A.

Development of a new personalized model of Huntington's disease

Institute of cytology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. To develop a patient-specific model of Huntington's disease, trans-differentiation of dermal fibroblasts into induced striatal neurons was used. The new model can be used to study the pathogenesis of the disease, as well as for individual assessment of the progression of the pathology in patients.

Keywords: Huntington's disease; fibroblasts; induced neurons; direct reprogramming.

Для разработки таргетной терапии необходимо наиболее полное понимание молекулярно-клеточных основ патогенеза этих заболеваний с учетом особенностей течения заболевания у конкретного пациента. В настоящее время подавляющее большинство этих знаний получают с помощью мышиных моделей, которые перенимают основные патологические признаки заболевания за счет наличия мутантного гена в геноме. Однако такие модели не позволяют учесть индивидуальные особенности течения заболевания, и, соответственно, реализовать персонализированный подход к лечению. Болезнь Хантингтона (БХ) является наследственным неизлечимым нейродегенеративным заболеванием, поражающим преимущественно нейроны стриатума. В настоящем исследовании мы успешно применили оптимизированный протокол [1] для получения индуцированных нейронов стриатума, основанную на прямом репрограммировании дермальных фибробластов пациентов с БХ. В индуцированных нейронах стриатума, полученных путем прямого репрограммирования дермальных фибробластов пациентов с БХ (HD iSN) наблюдаются агрегаты мутантного хантингина, однако количество клеток, содержащих агрегаты, составляет менее 5% от общего числа. Мы также показали, что уровень мембранного потенциала митохондрий, детектируемы при помощи TMRM в индуцированных HD iSN ниже, чем индуцированных нейронах стриатума, полученных из фибробластов здоровых доноров (HC iSN). Также HD iSN характеризуются более простым строением дендритного дерева по сравнению с HC iSN. В частности, наблюдается снижение количества первичных дендритов, их ветвистости, общего количества отростков и общей длины дендритов. Кроме того, HD iSN, более уязвимы к клеточной гибели, вызванной удалением нейротрофических факторов из культуральной среды и более чувствительны к эксайтотоксичному действию глутамата. Таким образом, разрабатываемая клеточная модель отражает характерный патологический фенотип БХ на клеточном уровне. Новая модель может применяться как для изучения молекулярно-клеточных основ патогенеза заболевания, для того чтобы получить более полную картину, так и для индивидуальной оценки прогрессирования патологии у пациентов с БХ. Кроме

того, проверка потенциальных лекарственных препаратов на разрабатываемой модели может стать важным этапом доклинических исследований и будет полезным дополнением к уже имеющимся животным моделям БХ и моделям на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Такой комплексный подход в будущем позволит всесторонне оценить терапевтический потенциал препаратов перед началом клинических испытаний.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063

Список литературы

1. Kraskovskaya N., Bolshakova A., Khotin M., et al. Protocol optimization for direct reprogramming of primary human fibroblast into induced striatal neurons // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 7. ID 6799. doi: 10.3390/ijms24076799

Кривова Ю.С.✉, Прощина А.Е., Отлыга Д.А., Харламова А.С., Годовалова О.С.

Распределение прогормон конвертазы 1/3 в развивающейся поджелудочной железе человека

Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

✉ homulkina@rambler.ru

Аннотация. В развивающейся поджелудочной железе человека PC1/3 обнаружена в многочисленных клетках, не содержащих инсулин. В части этих клеток одновременно выявляются PC1/3 и глюкагон. Можно предположить, что при дифференцировке β -клеток PC1/3 появляется до инсулина, и временно экспрессируется глюкагон.

Ключевые слова: поджелудочная железа человека; развитие человека; β -клетки; α -клетки; инсулин; глюкагон; прогормон конвертаза 1/3.

Krivova Yu.S., Proshchina A.E., Otllyga D.A., Kharlamova A.S., Godovalova O.S.

Distribution of prohormone convertase 1/3 in the developing human pancreas

Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russia

Abstract. In the developing human pancreas, PC1/3 was found in numerous cells negative for insulin. Some of these cells simultaneously contained PC1/3 and glucagon. It can be assumed, that in differentiating β -cells PC1/3 appear prior to insulin, and transient expression of glucagon can be observed.

Keywords: human pancreas; human prenatal development; β -cells; α -cells; insulin; glucagon; prohormone convertase 1/3.

Разработка методов возобновления популяции β -клеток поджелудочной железы для нормализации углеводного обмена у пациентов с сахарным диабетом является одной из ключевых проблем в современной диабетологии. Для решения этой проблемы крайне важны детальные сведения о механизмах дифференцировки и созревания β -клеток в ходе пренатального онтогенеза. Известно, что у взрослых людей популяция β -клеток обладает высокой степенью гетерогенности, которая проявляется, в том числе, в различном содержании внутри клеток прогормона (проинсулина), гормона (инсулина) и ключевого фермента, необходимого для процессинга проинсулина в инсулин — прогормон конвертазы 1/3 (PC1/3) [1]. Предполагают, что данная гетерогенность популяции β -клеток может отражать динамику их созревания: от стадии накопления проинсулина (проинсулин+PC1/3- клетки), к стадии синтеза инсулина из проинсулина (проинсулин+PC1/3+ клетки), и стадии возобновления содержания проинсулина (проинсулин-/PC1/3+ клетки) [1]. В то же время, нарушения процессинга проинсулина, приводящие к появлению в поджелудочной железе большого количества проинсулин+/инсулин- клеток, рассматривают в качестве одной из возможных причин возникновения дефицита инсулина у пациентов с сахарным диабетом [2, 3]. При этом сведения о распределении ферментов, необходимых для биосинтеза инсулина, в развивающейся поджелудочной железе человека, крайне ограничены и не дают комплексного представления о механизмах созревания β -клеток. Цель данного исследования — проанализировать распределение PC1/3 в β - и α -клетках в ходе пренатального развития поджелудочной железы человека. Работа выполнена на аутопсийном материале

поджелудочной железы 15 плодов с 8-й по 25-ю недели гестационного развития (г.р.) методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания с применением следующих комбинаций антител: мышинные моноклональные антитела к инсулину (Sigma, Кат. № I2018) + кроличьи моноклональные антитела к PC1/3 (Abcam, Кат. № ab220363); мышинные моноклональные антитела к глюкагону (Sigma, Кат. № G2654) + кроличьи моноклональные антитела к PC1/3. На ранних сроках развития (8–12 недель г.р.) в зачатке поджелудочной железы присутствуют единичные β - и α -клетки, и их небольшие кластеры, тесно ассоциированные с первичными протоками. С 13–14-й недели г.р. в поджелудочной железе, наряду с отдельными эндокринными клетками и их кластерами, появляются панкреатические островки. На исследованных сроках развития иммуноположительная реакция с антителами к PC1/3 наблюдалась в большинстве β -клеток (PC1/3+инсулин+клетки), что согласуется с результатами, полученными на образцах поджелудочной железы взрослых [1–4]. Вместе с тем, начиная с 8-й недели г.р., в протоках поджелудочной железы и кластерах эндокринных клеток выявляются единичные PC1/3+ клетки с иммунонегативной реакцией на инсулин (PC1/3+инсулин-клетки). В панкреатических островках плодов с 13-й по 25-ю недели г.р., наряду с PC1/3+инсулин+ β -клетками, обнаружены многочисленные PC1/3+инсулин-клетки. Интенсивность реакции на PC1/3 в этих клетках была существенно ниже, чем в β -клетках. Согласно данным литературы, в панкреатических островках взрослых PC1/3+клетки с иммунонегативной реакцией на инсулин единичные [4]. Можно предположить, что многочисленные PC1/3+инсулин-клетки, выявленные в формирующихся панкреатических островках, представляют собой созревающие β -клетки, в которых происходит накопление фермента (PC1/3), необходимого для биосинтеза инсулина. При анализе колокализации PC1/3 с глюкагоном установлено, что в большинстве α -клеток реакция на PC1/3 иммунонегативная (PC1/3-глюкагон-клетки). Однако, в эпителии протоков и в составе панкреатических островков обнаружены единичные клетки, в которых наблюдалась колокализация PC1/3 и глюкагона (PC1/3+глюкагон+клетки). В панкреатических островках PC1/3+глюкагон+клетки выявлялись среди клеток с низкой интенсивностью реакции на PC1/3. У взрослых биосинтез глюкагона осуществляется преимущественно прогормон конвертазой 2 (PC2) и в меньшей степени PC1/3, которая выявляется лишь в единичных α -клетках [4]. С другой стороны, в период пренатального развития в поджелудочной железе, в том числе и у человека, присутствуют бигормональные (инсулин+глюкагон+) клетки [5], которые по мнению большинства авторов представляют собой отдельные этапы дифференцировки и созревания эндокринных клеток. Исходя из этих данных можно предположить, что обнаруженные нами PC1/3+глюкагон+клетки представляют собой дифференцирующиеся β -клетки, в которых наблюдается временная экспрессия глюкагона. Таким образом, в период пренатального развития в составе формирующихся панкреатических островков присутствуют многочисленные PC1/3+ клетки, не содержащие инсулин. Такие клетки вероятно представляют собой созревающие β -клетки, в которых накопление фермента PC1/3 происходит до начала синтеза инсулина. В части этих клеток обнаружена колокализация PC1/3 с глюкагоном, что свидетельствует о возможной временной экспрессии глюкагона в дифференцирующихся и созревающих β -клетках.

Список литературы

1. Teitelman G. Human islets contain a beta cell type that expresses proinsulin but not the enzyme that converts the precursor to insulin // *J Histochem Cytochem*. 2020. Vol. 68, N 10. P. 691–702. doi: 10.1369/0022155420961361
2. Sims E.K., Syed F., Nyalwidhe J., et al. Abnormalities in proinsulin processing in islets from individuals with longstanding T1D // *Transl Res*. 2019. Vol. 213. P. 90–99. doi: 10.1016/j.trsl.2019.08.001
3. Rodriguez-Calvo T., Chen Y.C., Verchere C.B., et al. Altered β -cell prohormone processing and secretion in type 1 diabetes // *Diabetes*. 2021. Vol. 70, N 5. P. 1038–1050. doi: 10.2337/dbi20-0034
4. Portela-Gomes G.M., Grimelius L., Stridsberg M. Prohormone convertases 1/3, 2, furin and protein 7B2 (Secretogranin V) in endocrine cells of the human pancreas // *Regul Pept*. 2008. Vol. 146, N 1–3. P. 117–124. doi: 10.1016/j.regpep.2007.09.019
5. Riopel M., Li J., Fellows G.F., et al. Ultrastructural and immunohistochemical analysis of the 8–20 week human fetal pancreas // *Islets*. 2014. Vol. 6, N 4. ID e982949. doi: 10.4161/19382014.2014.982949

Кригер Д.В.✉, Поденкова У.И., Бахмет Е.И., Томилин А.Н., Цимоха А.С.

Экспрессия генов иммунопротеасом на ранних этапах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ daryamalikova@gmail.com

Аннотация. Исследование посвящено изучению роли иммунопротеасом в ранней дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши. Показано, что у мыши переход ЭСК из наивного состояния плюрипотентности в праймированное сопровождается увеличением экспрессии генов иммунопротеасом.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; плюрипотентность; убиквитин-протеасомная система; иммунопротеасомы; дифференцировка клеток.

Kruger D.V., Podenkova U.I., Bakhmet E.I., Tomilin A.N., Tsimokha A.S.

Expression of immunoproteasome genes in the early differentiation of mouse embryonic stem cells

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study investigates the role of immunoproteasomes in early differentiation of mouse embryonic stem cells (ESCs). It demonstrates that the transition of ESCs from a naïve to a primed pluripotent state in mice is associated with increased expression of immunoproteasome genes.

Keywords: embryonic stem cells; pluripotency; ubiquitin-proteasome system; immunoproteasomes; cell differentiation.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) играют центральную роль в раннем развитии млекопитающих, будучи источником всех типов клеток, которые формируют тело взрослого организма. Их уникальная способность к самообновлению и дифференцировке зависит от точно регулируемых механизмов поддержания геномной стабильности и белкового гомеостаза (протеостаза). Одной из ключевых клеточных систем, регулирующих протеостаз, является убиквитин-протеасомная система (УПС). УПС обеспечивает высокоспецифичную деградацию белков, что позволяет тонко регулировать различные клеточные процессы, включая транскрипцию, репарацию ДНК, прохождение по клеточному циклу, реакцию на стресс и апоптоз. Кроме того, показано, что УПС является важным регулятором в поддержании плюрипотентности ЭСК [1]. Например, УПС обеспечивает динамическую регуляцию оборота ключевых транскрипционных факторов стволовости, тем самым позволяя ЭСК сохранять свою плюрипотентность и оставаться готовыми к дифференцировке в различные типы клеток по мере необходимости.

Важнейшим компонентом УПС является протеасома. Она представляет собой мультисубъединичный комплекс, состоящий из коровой частицы, так называемой 20S протеасомы, и регулятора. В состав коровой частицы входят три каталитические субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 5$), которые отвечают за протеолитические свойства протеасомы. В ответ на провоспалительные сигналы в клетках собирается иммунопротеасома, где конститутивные каталитические субъединицы заменяются индуцибельными. Считается, что иммунопротеасомы более эффективно расщепляют белки по сравнению с их конститутивными аналогами и генерируют пептиды, которые лучше связываются с молекулами МНС-I. Дисрегуляция иммунопротеасом ассоциирована с развитием иммунодефицитов у мышей и аутоиммунных заболеваний. Также показана экспрессия иммунопротеасом в ЭСК человека [2] и в ранней дифференцировке ЭСК мыши [3], что предполагает их роль в поддержании плюрипотентности и в дифференцировке ЭСК. В своей работе мы осуществили детальный

анализ экспрессии генов иммунопротеасом на ранних этапах дифференцировки ЭСК мыши с помощью методов ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для поддержания самообновления и плюрипотентности эмбриональные стволовые клетки должны сохранять баланс активности различных сигнальных путей, среди которых ключевую роль играет путь LIF/STAT3. Добавление LIF в культуральную среду необходимо для длительной пролиферации ЭСК, обеспечивая при этом сохранение их плюрипотентных свойств. Поэтому для начала мы проанализировали экспрессию генов иммунопротеасом в клетках, пролиферирующих в отсутствие LIF. Мы обнаружили, что в отсутствие LIF происходит увеличение экспрессии генов субъединиц иммунопротеасомы (*Lmp7*, *Lmp2* и *Mecl-1*) одновременно со снижением экспрессии *Oct4* и повышением экспрессии гена *Fgf5*, который является маркером постимплантационного эпибласта и праймированного плюрипотентного состояния.

В последние годы выделяют несколько типов плюрипотентных стволовых клеток, различающихся по стадии эмбриогенеза, активным сигнальным путям и факторам роста, необходимым для поддержания этих клеток в культуре [4]. Поэтому, для подтверждения полученных данных, мы провели анализ экспрессии генов иммунопротеасом в условиях, которые позволяют целенаправленно поддерживать ЭСК в разных состояниях плюрипотентности. Мы обнаружили, что пик экспрессии генов иммунопротеасом приходится на клетки, находящиеся в состоянии формативной плюрипотентности (эпибластоподобные клетки).

Таким образом, мы установили, что иммунопротеасомы активируются на ранних этапах формативной плюрипотентности, что свидетельствует об их важной роли в регуляции перехода клеток из наивного состояния к праймированному и последующей дифференцировке.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-14-00390.

Список литературы

1. Buckley S.M., Collin J., Irina N., et al. Regulation of pluripotency and cellular reprogramming by the ubiquitin-proteasome system // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 11, N 6. P. 783–798. doi: 10.1016/j.stem.2012.09.011
2. Atkinson S.P., Aranda-Orgilles B., Strikoudis A., et al. A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, N 7. P. 1373–1384. doi: 10.1002/stem.1113
3. Hernebring M., Fredriksson Å., Liljevald M., et al. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28 // *Sci Rep*. 2013. Vol. 3, N 1. ID 1381. doi: 10.1038/srep01381
4. Гордеев М.Н., Бахмет Е.И., Томилин А.Н. Динамика плюрипотентности в эмбриогенезе и в культуре // *Онтогенез*. 2021. Т.52, № 6. С. 429–440. EDN: SEPMPR doi: 10.31857/s0475145021060057

Крохичева П.А.¹ ✉, Свиридова И.К.², Гольдберг М.А.¹, Хайрутдинова Д.Р.¹, Ахмедова С.А.²,
Кирсанова В.А.², Сергеева Н.С.², Комлев В.С.¹

Подходы к созданию биорезорбируемых цементных материалов для замещения костных дефектов

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Обнинск, Россия

✉ polinariakroh@gmail.com

Аннотация. Разработка научных основ создания новых композиционных магний-кальций фосфатных цементных (МКФЦ) материалов, предназначенных для замещения и регенерации костных тканей, является актуальной задачей современного материаловедения. Существует реальная потребность в создании новых биорезорбируемых цементных материалов, обладающих необходимыми свойствами биовизуализации и терапевтического эффекта, для замещения костных дефектов.

Ключевые слова: цементный материал; кальций фосфаты; магний фосфаты; биосовместимость; биорезорбируемость; антибактериальные свойства; вертебропластика; кифопластика; реконструктивная хирургия.

Krokhicheva P.A.¹, Sviridova I.K.², Goldberg M.A.¹, Khayrutdinova D.R.¹, Akhmedova S.A.², Kirsanova V.A.², Sergeeva N.S.², Komlev V.S.¹

Approaches to the development of bioresorbable cement materials for bone defect replacement

¹ Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² P.A. Hertsen Moscow Oncology Research Institute — branch of National Medical Research Radiological Centre affiliated with Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. The development of scientific bases for the creation of new composite magnesium-calcium phosphate cement (MCPC) materials designed for bone tissue replacement and regeneration is an urgent task of modern materials science. There is a real need for the creation of new bioresorbable cement-based materials, with non-necessary properties of bioimaging and therapeutic effect, for the replacement of bone defects.

Keywords: cement material; calcium phosphates; magnesium phosphates; biocompatibility; bioresorbability; antibacterial properties; vertebroplasty; kyphoplasty; reconstructive surgery.

Гетерогенность заболеваний костной ткани требует дальнейшего изучения стратегий клинического лечения и новых костно-замещающих материалов, обладающих широким спектром свойств, позволяющих проводить неразрушающие методы контроля процесса восстановления костной ткани с одновременным терапевтическим лечением. Для заполнения костных дефектов в настоящее время предпринимаются значительные усилия по изучению цементов на основе фосфатов магния, таких как струвит ($MgNH_4PO_4 \cdot 6H_2O$) или ньюберит ($MgHPO_4 \cdot 3H_2O$), которые являются перспективными альтернативами фосфатам кальция (ФК) [1]. Недавно Mg-содержащие материалы, в том числе магнийфосфатные цементы (МФЦ), продемонстрировали улучшенную биосовместимость, способность к полной резорбции в организме и биоактивность в формировании костного матрикса в процессе остеогенеза [2]. Фосфаты магния, наряду с фосфатами кальция, стали рассматриваться как оптимальный материал для восстановления костных дефектов, однако научная задача для МКФЦ все еще остается актуальной.

Работа посвящена получению и изучению новых цементных материалов на основе системы фосфат магния- фосфат кальция для применения в реконструктивно-восстановительной хирургии. Был получен широкий спектр материалов на основе фазы ньюбериит, допированных антибактериальными катионами серебра (Ag), цинка (Zn), катионами редкоземельных элементов (РЗМ) гадолия (Gd), европия (Eu). Было подтверждено вхождение катионов в основную фазу цементных порошков физико-химическими методами и методом ЭПР-спектроскопии, наблюдалось сохранение ионов в решетке в процессе взаимодействия цементного порошка с цементной жидкостью. Введение катионов влияет на механические и антибактериальные свойства, на процесс растворимости, биологические свойства, а также на возможность биовизуализации. Так, наилучшими механическими свойствами обладает материал, допированный Zn, усиление антибактериальной активности происходит при введении катиона Ag, улучшение контрастности при микроКТ и визуализации при МРТ наблюдалось у материалов, допированных Gd, люминесцентные свойства наблюдаются у материалов, допированных Eu. Кроме того, исследования цитосовместимости *in vitro* показали, что МКФЦ эффективно поддерживают адгезию и пролиферацию преостеобластов MG63 и обладают остеокондуктивными потенциальными образуя новую костную ткань к 32 неделе эксперимента *in vivo*. Таким образом, продемонстрированы подходы к получению МКФЦ с различными характеристиками, зависящих от природы вводимого катиона, которые являются перспективным материалом для заполнения костных дефектов.

Исследование влияния катионов было выполнено при поддержке Российского Научного Фонда, грант № 23-63-10056, цементная матрица на основе кальциймагний фосфатов и ее биологические испытания были проведены в рамках Государственного задания № 056-03-2024-113.

Список литературы

1. Haque M.A., Chen B. *In vitro* and *in vivo* research advancements on the magnesium phosphate cement biomaterials: A review // *Materialia* (Oxf). 2020. Vol. 13. ID 100852. doi: 10.1016/j.mtla.2020.100852
2. Kroklicheva P.A., Goldberg M.A., Fomin A.S., et al. Enhanced bone repair by silver-doped magnesium calcium phosphate bone cements // *Ceram Int*. 2023. Vol. 49, N 11-B. P. 19249–19264. doi: 10.1016/j.ceramint.2023.03.052

Кручинина А.Д.¹, Рахматулина Л.А.¹ ✉, Глумскова Ю.А.², Венедиктов А.А.²

Исследование структуры децеллюляризованных коллагеновых матриц на основе ксеноперикарда

¹ Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

² Кардиоплант, Пенза, Россия

✉ leiysanazatovna@mail.ru

Аннотация. Коллагеновые матрицы получали из ксеноперикарда путем обработки трипсином. Эффективность обработки оценивали по содержанию ДНК. Поверхность образцов изучали методом сканирующей электронной микроскопии. Дифференциальную окраску по Лилли использовали для оценки состояния коллагенового матрикса.

Ключевые слова: децеллюляризация; биоматериал; коллагеновый матрикс; регенерация тканей; тканеинженерные конструкции; ксеноперикард.

Kruchinina A.D.¹, Rahmatulina L.A.¹, Glumskova J.A.², Venediktov A.A.²

Study of the structure of decellularized collagen matrix based on xenopericardium

¹ Penza State University, Penza, Russia

² Ltd. Cardioplant, Penza, Russia

Abstract. Collagen matrixes were prepared from xenopericardium by trypsin treatment. The efficiency of treatment was evaluated by DNA content. The surface of the samples was studied by scanning electron microscopy. Differential Lilly staining was used to assess the state of collagen matrix.

Keywords: decellularization; biomaterial; collagen matrix; tissue regeneration; tissue engineering structures; xenopericardium.

Активное развитие и совершенствование методов регенеративной медицины привело к формированию потребности в высокофункциональных материалах. Коллагеновые матрицы находят широкое применение в качестве биоматериалов для направленной регенерации тканей и могут быть использованы для создания тканеинженерных конструкций. Сырьем для их получения служат различные коллагенсодержащие структуры, в том числе перикард, образованный волокнистой соединительной тканью. Удаление клеток из материала позволяет эффективно снизить иммуногенность коллагеновых матриц [1]. Существуют различные протоколы децеллюляризации, включающие химическую обработку с применением растворов щелочей, кислот, детергентов, ферментов и т.д., зачастую приводящую к повреждению ультраструктуры, что сказывается на тромбогенности и биоинтеграции [2]. Участки разволокнения и продольных микро-разрывов могут инициировать тромбообразование, DAMP-иммунный ответ, резорбцию и/или асептический кальциноз [3]. Компоненты внеклеточного матрикса (коллагены, эластин, протеогликаны, интегрины, фибронектины и др. [4]) выполняют роль каркаса и регулируют процессы ремоделирования, после имплантации происходит свободная миграция клеток реципиента в матрикс с последующим восстановлением архитектоники поврежденного участка. Таким образом, протокол обработки, обеспечивающие наиболее полное удаление клеток и их компонентов с наименьшим повреждением ультраструктуры является наиболее предпочтительным для получения децеллюляризованных коллагеновых матриц. В настоящем исследовании для получения децеллюляризованных коллагеновых матриц использовали перикард животного происхождения: свиной, телячий, конский. К достоинствам ксеноматериалов можно отнести возможность

забора в больших объемах, низкий риск передачи вирусных частиц, биологическую активность и структуру нативной ткани. Децеллюляризация проводилась путем ферментативной обработки с использованием трипсина. Оценку эффективности обработки проводили путем количественного анализа содержания ДНК с расчетом на сухой вес образца. Содержание ДНК в нативных материалах составило 227 ± 24 нг/мг ткани в свином, 195 ± 17 нг/мг ткани в телячьем, 214 ± 22 нг/мг ткани в конском перикардах, во всех образцах после ферментативной децеллюляризации содержание ДНК составило менее 15 нг/мг ткани, что свидетельствует об эффективности протокола обработки. Для анализа поверхности образцов экспериментальных материалов использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Во всех нативных материалах на поверхности обнаружен сиропообразный слой (предположительно, гликозаминогликановый), покрывающий сверху коллагеново-ламининовый матрикс. Установлено, что после децеллюляризации данный слой становится менее выраженным. Для оценки состояния коллагенового матрикса проводили гистологический анализ материалов с использованием дифференциальной трехцветной окраски по Лилли, при которой зрелый и неповрежденный коллаген окрашивается кислотным красителем Fast Green FCF в бирюзово-голубой цвет, а незрелый или поврежденный коллаген остается красного цвета. Во всех образцах после децеллюляризации отмечена утрата плотной фибриллярной структуры. Наблюдаются участки, не подвергающиеся селективному удалению фонового (красного) красителя, что говорит о нарушении фибриллярной структуры коллагена в данных областях по типу мукоидного (с подозрением на фибриноидное) набухания. Такие повреждения вероятно вызваны нарушением гликозаминогликанов в структуре волокон коллагена и последующей перегидратацией матрикса, о которой свидетельствует отек и разбухание фибрилл с потерей четких контуров волоконной структуры матрикса. Объем образцов после децеллюляризации значительно превышает объем образцов нативного материала. Применение сшивающих агентов для химической фиксации материала приводит к уплотнению и частичному восстановлению архитектоники коллагенового матрикса, который вновь приобретает фибриллярную структуру с маскировкой зон повреждения.

Список литературы

1. Старцева О.И., Синельников М.Е., Бабаева Ю.В., Трущенко В.В. Децеллюляризация органов и тканей // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2019. № 8. С. 59–62. EDN: TVLFVV doi: 10.17116/hirurgia201908159
2. Theocharis A.D., Skandalis S.S., Gialeli C., Karamanos N.K. Extracellular matrix structure // Adv Drug Deliv Rev. 2016. Vol. 97. P. 4–27. doi: 10.1016/j.addr.2015.11.001
3. Звягина А.И., Даль А.И., Минайчев В.В., и др. Пассивный асептический кальциноз фиксированных перикардиальных биоматериалов опосредован нарушениями структуры и микроархитектоники их внеклеточного матрикса // Биофизика. 2022. Т. 67, № 1. С. 160–167. EDN: MVOBXU doi: 10.31857/S0006302922010173
4. Mendibil U., Ruiz-Hernandez R., Retegi-Carrion S., et al. Tissuespecific decellularization methods: rationale and strategies to achieve regenerative compounds // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, N 15. ID 5447. doi: 10.3390/ijms21155447

Кручинина А.Д.¹ ✉, Попова П.А.¹, Глумскова Ю.А.², Венедиктов А.А.²

Оценка биосовместимости скаффолдов на основе коллагенового гидрогеля

¹ Пензенский государственный университет, Пенза, Россия

² Кардиоплант, Пенза, Россия

✉ a.d.kruchinina@mail.ru

Аннотация. Коллагеновые гидрогели являются перспективными материалами для регенеративной медицины и используются для получения скаффолдов для клеток. Актуальным является изучение возможности модификации биологически активными веществами и лекарственными препаратами и проведение исследований *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: коллагеновый гидрогель; скаффолд; культивирование клеток; биосовместимость; ксеноперикард.

Kruchinina A.D.¹, Popova P.A.¹, Glumskova J.A.², Venediktov A.A.²

Study of biocompatibility of scaffolds based on collagen hydrogel

¹ Penza State University, Penza, Russia

² Ltd. Cardioplant, Penza, Russia

Abstract. Collagen hydrogels are promising materials for regenerative medicine and are used to produce scaffolds for cells. It is relevant to study the possibility of modification with biologically active substances and drugs and to conduct *in vitro* and *in vivo* studies.

Keywords: collagen hydrogel; scaffold; cell culture; biocompatibility; xenopericardium.

В настоящее время в регенеративной медицине по-прежнему актуальной остается проблема замещения дефектов тканей и органов. Развитие данного направления послужило толчком к разработке и внедрению в практику новых биоматериалов и клеточных продуктов. Коллаген является основным фибриллярным гликопротеином соединительной ткани млекопитающих и совместно с другими компонентами внеклеточного матрикса создает структурный каркас и микроокружение для клеток. Материалы на основе коллагена являются наиболее перспективными для культивирования и трансплантации клеток. Процесс выделения коллагена из тканей животного происхождения сопряжен с разрушением межмолекулярных связей и частичным повреждением пространственной архитектоники, что приводит к потере структурных и механических свойств. Гидрогели представляют собой гидрофильные полимерные сети, способные поглощать и удерживать воду или биологическую жидкость, сохраняя свою структуру и свойства [1]. Для стабилизации и придания механической прочности используют различные сшивающие агенты: глутаровый альдегид, генипин, имидазы, карбоновые кислоты и др. [2]. Их применение сопряжено с риском появления цитотоксического действия, что свидетельствует о необходимости тщательного подбора условий обработки. Возможность модификации гидрогеля биологически активными веществами (например, факторами роста, цитокинами) или лекарственными препаратами позволяет использовать их в качестве средства доставки. Скаффолды для регенеративной медицины должны соответствовать ряду требований: выступать в роли каркаса для клеток и средства доставки для биологически активных веществ, быть биodeградируемыми и биосовместимыми, соответствовать по форме и размеру дефекту и т.д. [3]. В данном исследовании в качестве сырья для получения коллагенового гидрогеля использовали телячий ксеноперикард. Сформированный из гидрогеля скаффолд стабилизировали с помощью N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)

карбодиимида, проводили лиофилизацию. Свойства полученного биоматериала изучали с использованием клеточных культур и в имплантационных тестах. В тестах *in vitro* исследовали контактное (культивирование на поверхности) и бесконтактное (культивирование в экстрактах, полученных из экспериментальных материалов) цитотоксическое действие экспериментального материала путем оценки жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека через 24 и 96 часов культивирования. Результаты свидетельствуют об отсутствии цитотоксического действия образцов. Для исследования биосовместимости проводили гетеротопическую подкожную имплантацию в межлопаточную область самцам крыс Wistar. Оценка клеточной и тканевой реакции, степени биоинтеграции и скорости резорбции осуществляли в динамике на разных сроках после имплантации с помощью гистохимического анализа. Полученные результаты свидетельствуют о высокой биосовместимости скаффолдов на основе коллагенового гидрогеля и их полной резорбции в течение 3 месяцев после имплантации.

Список литературы

1. Дубров В.Э., Климашина Е.С., Щербаков И.М., и др. Возможности получения и применения биоматериалов на основе гидрогелей для регенерации костной ткани человека // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21, № 3. С. 141–150. EDN: JTIZZL doi: 10.15825/1995-1191-2019-3-141-150
2. Нащекина Ю.А., Луконина О.А., Михайлова Н.А. Химические сшивающие агенты для коллагена: механизмы взаимодействия и перспективность применения в регенеративной медицине // Цитология. 2020. Т. 62, № 7. С. 459–472. EDN: LXSAMR doi: 10.31857/S0041377120070044.
3. Никольский В.И., Сергацкий К.И., Шерemet Д.П., Шабров А.В. Скаффолд-технологии в восстановительной медицине: история проблемы, современное состояние и перспективы применения // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2022. № 11. С. 36–41. EDN: KFGCHV doi: 10.17116/hirurgia202211136

Кудан Е.В.

Возможности трехмерной биопечати в тканевой инженерии и регенеративной медицине

НИТУ МИСИС, Москва, Россия

✉ kudan.ev@misis.ru

Аннотация. Традиционные методы тканевой инженерии не позволяют создавать биологические объекты с заданной архитектурой. Решение этой проблемы возможно путём развития технологии трехмерной биопечати, позволяющей как формировать эквиваленты органов и тканей, так и проводить лечение дефектов сложной формы.

Ключевые слова: гибридная биопечать; *in situ* биопечать; биочернила; сфероиды; гидрогели; эквиваленты органов и тканей.

Koudan E.V.

The potential of three-dimensional bioprinting in the field of tissue engineering and regenerative medicine

NUST MISIS, Moscow, Russia

Abstract. Traditional tissue engineering methods do not allow the creation of biological objects with a predetermined architecture. This problem can be solved by developing the technology of three-dimensional bioprinting, which allows both the fabrication of organ and tissue equivalents and the treatment of defects with complex shapes.

Keywords: hybrid bioprinting; *in situ* bioprinting; bioinks; spheroids; hydrogels; organ and tissue equivalents.

Трехмерная биопечать — инновационная технология, которая получила широкое развитие в последнее десятилетие. Она направлена на создание тканеинженерных конструкций из живых клеток с помощью биопринтера согласно заранее заданной цифровой модели. Основными компонентами технологии являются биопринтер и биочернила, в роли которых выступают клетки или клеточные агрегаты и поддерживающие их структуры, как правило, гидрогели. На первом этапе создается цифровая модель будущей тканеинженерной конструкции, за этим следует процесс биопечати и на последнем этапе происходит созревание напечатанной структуры в биореакторе для установления плотных межклеточных контактов, синтеза внеклеточного матрикса и формирования полноценной ткани.

Существует много различных вариантов технологии биопечати [1]. Однако глобально можно выделить три направления: *in vitro*, *in situ* и гибридную биопечать.

Биопечать *in vitro* позволяет создавать небольшие тканеинженерные структуры с точным расположением разных типов клеток. Полученные конструкции могут быть использованы в качестве эквивалентов тканей и органов с целью их последующей имплантации пациентам, а также в качестве 3D-моделей, предназначенных для тестирования лекарственных препаратов, косметологических средств или для моделирования биологических процессов в тканях в условиях *in vitro*. Нами была создана биопечатная модель карциномы поджелудочной железы, состоящая из сфероидов из опухолевых клеток и фибробластов, а также гидрогеля на основе желатина и альгината. Были напечатаны тканеинженерные конструкторы с различным дизайном, которые были исследованы с помощью иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии. Было проанализировано влияние дизайна на кинетику формирования и биомиметичность получаемых конструкторов

и выбран оптимальный вариант дизайна. Затем была сравнена активность гемцитабина на монослое клеток, тканевых сфероидах и напечатанных конструктах.

Биопечать *in situ* предполагает нанесение биологического материала на тело пациента непосредственно в раневое ложе. При таком подходе не требуется дозревание напечатанной структуры после печати, поскольку она сразу попадает в организм пациента, выступая в роли естественного биореактора. Для биопечати *in situ* используют биопринтеры на основе роботических рук. Это позволяет проводить печать на сложных поверхностях неровной формы под разными углами, подстраиваясь по дыхательные движения пациента. В настоящее время данная технология биопечати используется для регенерации дефектов мягких тканей, а также при лечении повреждений костно-хрящевой ткани [2]. Совместно с Главным военным клиническим госпиталем им. академика Н.Н. Бурденко с помощью *in situ* биопринтера нами было проведено заполнение обширного дефекта мягких тканей в области плеча и лопатки коллагеновым гидрогелем, содержащим клетки костного мозга пациента.

Гибридная биопечать совмещает печать синтетическими биосовместимыми полимерами и биопечать гидрогелями и клетками. Гибридная биопечать предназначена для создания имплантатов, сочетающих в себе прочный хрящевой или костный каркас и мягкие окружающие ткани. Используя данную технологию, нами были напечатаны имплантаты ушной раковины, состоящие из полиуретанового каркаса, имеющие ребра жесткости из полилактида и заполненные коллагеновым гидрогелем, содержащим хондроциты [3]. Совместно с Национальным медицинским исследовательским центром оториноларингологии ФМБА России имплантаты подшивали под височную фасцию двум мини-пигам. Спустя три месяца образцы были извлечены и проведена оценка прорастания в них тканей с помощью гистологии и иммуногистохимии. Наблюдалось образование соединительнотканного регенерата с собственной сосудистой сетью. Строение волоконного остова регенерата было подстроено под форму конструкции, обеспечивая объединенный ответ на внешнее действие механических сил. Признаков отторжения каркасов не было. Регенерат заполнил весь объем имплантата. Полученные результаты продемонстрировали перспективность разработанной технологии для создания имплантов ушной раковины и возможность их клинического применения для пациентов с микротией.

За последнее десятилетие трехмерная биопечать уже стала мощным инструментом в арсенале тканевых инженеров. Дальнейшее развитие технологии позволит решать с её помощью самые разнообразные задачи тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Список литературы

1. Magin C.M., Alge D.L., Anseth K.S. Bio-inspired 3D microenvironments: a new dimension in tissue engineering // *Biomed Mater.* 2016. Vol. 11, N 2. ID 022001. doi: 10.1088/1748-6041/11/2/022001
2. Levin A.A., Karalkin P.A., Koudan E.V., et al. Commercial articulated collaborative *in situ* 3D bioprinter for skin wound healing // *Int J Bioprint.* 2023. Vol. 9, N 2. ID 675. doi: 10.18063/ijb.v9i2.675
3. Дайхес Н.А., Диаб Х.М., Назарян Д.Н., и др. Комбинированные матрицы и тканевые инженерные конструкции из биополимеров в реконструктивно-восстановительной хирургии ЛОР-органов // *Медицина экстремальных ситуаций.* 2024. Т. 26, № 1. С. 43–49. EDN: CFEBFB doi: 10.47183/mes.2024.007

Кузин С.М.

Особенности пролиферации клеток эпителия пищевода мышей, синхронизированных и рассинхронизированных с циркадианным ритмом митозов

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

✉ smkuzin@mail.ru

Аннотация. Показано, что в эпителии пищевода пассивную фазу циркадианного ритма пролиферации формируют асинхронные клетки, не подчиняющиеся регуляторам пролиферации или имеющие существенные генетические нарушения. Они имеют значительно большую вероятность перехода в терминальную дифференцировку и элиминации.

Ключевые слова: пролиферация клеток; митоз; синтез ДНК; эпителий пищевода; циркадианный ритм; дифференцировка клеток; синхронизация клеток; клеточный цикл.

Kuzin S.M.

Features of proliferation of the esophagus epithelial cells of mice synchronized and out of sync with the circadian rhythm of mitosis

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. It has been shown that in the esophagus epithelium, the passive phase of the proliferation circadian rhythm is formed by asynchronous cells. They do not obey proliferation regulators or have significant genetic damage. They have a significantly higher probability of transition to terminal differentiation and elimination.

Keywords: cell proliferation; mitosis; DNA synthesis; esophageal epithelium; circadian rhythm; cell differentiation; cell synchronization; cell cycle.

В основе физиологической и репаративной регенерации лежат процессы пролиферации и дифференцировки клеток. Во всех обновляющихся тканях пролиферация характеризуется выраженным циркадианным ритмом (ЦР), который формируется при действии в определенное время суток комплекса регуляторных митогенных факторов, стимулирующих вступление клеток в G1 период и контролирующих все этапы подготовки к делению. Эти клетки синхронно проходят все периоды митотического цикла и при делении образуют максимум ЦР митозов. Другая часть клеток рассинхронизирована с ритмом и делится на спаде митотической активности.

Нами изучены особенности кинетики синхронизированных и асинхронных популяций клеток, формирующих соответственно максимум и минимум ЦР пролиферативной активности в эпителии пищевода мышей. Были изучены ритмы деления клеток и синтеза ДНК при нормальном и инвертированном фоторежиме, параметры митотического (клеточного) цикла, ориентация оси митоза относительно базальной мембраны. Кинетику клеток и ритм синтеза ДНК изучали с использованием ³H-тимидина автордиографическим методом.

Данные, полученные при нормальном фоторежиме (свет с 8.00 до 20.00 часов), показали наличие выраженного монофазного ЦР синтеза ДНК и митозов. Ритм синтеза ДНК на 3–6 часов опережает ритм митозов, что отражает последовательность прохождения клетками периодов митотического цикла. После инверсии освещения ЦР синтеза ДНК и деления клеток сохраняются, но происходит их постепенный фазовый сдвиг влево в среднем на 0,5–1,0 часа за сутки за счет укорочения периода ритма. Как в контроле,

так и после инверсии фотопериода небольшая часть клеток делится в пассивную фазу ритма на минимуме митотической активности, то есть не подчиняется митогенной регуляции и синхронизирующим факторам, формирующим ЦР пролиферативной активности.

Полученные нами данные показали, что рассинхронизированные с ЦР клетки несколько медленнее проходят митотический цикл и отдельные его периоды. В частности, длительность S периода составляет 8,3 часа и 5,7 соответственно на минимуме и максимуме ритма синтеза ДНК. После деления значительно меньшая часть асинхронных клеток вступает в следующий митотический цикл по сравнению с синхронизированными (соответственно 14 и 35%), а доля митозов, ось которых направлена перпендикулярно базальной мембране, у них существенно больше по сравнению с синхронизированными (соответственно 33–51% и 2–36% в разных сериях опытов). Ориентация оси митоза определяет пространственное положение дочерних клеток и возможность их дифференцировки [1, 2]. Таким образом, наши данные свидетельствуют о значительно большей вероятности асинхронных клеток мигрировать в шиповатый слой, перейти в терминальную дифференцировку и элиминироваться из пищевода.

Результаты работы показали, что размножение клеток имеет строго определенную временную организацию, которая регулируется биологическими часами трех уровней. Внутриклеточные часы координируют последовательность процессов подготовки клеток к делению в G1, S, G2 периодах клеточного цикла и митозе. Тканеспецифические часы синхронизируют клетки органа и формируют циркадианные ритмы пролиферативной активности. Центральные часы супрахиазматических ядер гипоталамуса координируют разные биоритмы организма друг с другом и синхронизируют их с внешним фотопериодическим датчиком времени. Клетки, делящиеся в пассивную фазу ЦР, не контролируются синхронизирующими регуляторными факторами, действующими как на клеточно-популяционном, так и на организменном уровне. У них сохраняется внутриклеточная координация процессов подготовки к митозу, однако наблюдается их замедление на 1–3 часа.

ЦР пролиферации клеток является результатом регуляция по принципу отрицательных обратных связей, которая осуществляется двумя группами противоположно направленных факторов — онкогенов (митогенов) и супрессоров, стимулирующих размножение клеток при их недостатке или подавляющих при избытке. Последовательное и скоординированное действие этих факторов, подчиняющееся циркадианной периодичности, создает не только ритм, но и строго определенное количество клеток, необходимое для обновления или репаративной регенерации. На спаде и во время минимума ЦР митотической активности делятся рассинхронизированные клетки, не подчиняющиеся факторам регуляции пролиферации. В это время также могут делиться и клетки, которые среагировали на митогенную стимуляцию, но медленнее прошли подготовку к митозу, в частности, в результате их задержки в контрольных точках из-за генетических нарушений. По нашим данным, такая задержка может составлять 6 и более часов при сильном мутагенном воздействии [3].

Очевидно, что клетки, не подчиняющиеся действию факторов, регулирующих пролиферацию или имеющие генетические нарушения, представляют опасность для организма. Результаты нашей работы показали, что такие клетки, рассинхронизированные с циркадианным ритмом, имеют значительно большую вероятность терминальной дифференцировки и элиминации из ткани.

Список литературы

1. Winter C.M., Szekely P., Popov V., et al. SHR and SCR coordinate root patterning and growth early in the cell cycle // *Nature*. 2024. Vol. 626, N 7999. P. 611–616. doi: 10.1038/s41586-023-06971-z
2. Кузин С.М. Генетическая нестабильность при нарушении пространственной и временной организации стволовых клеток // *Гены и клетки*. 2019. Т. 14, № S. С. 129. EDN: NEYFZP
3. Kuzin S., Bogomolov D., Berechikidze I., et al. Peculiar features of bone marrow cell proliferation in djungarian hamsters with genetic disorders under thiotepa // *Farmatsia*. 2022. Vol. 69, N 2. P. 327–335. doi: 10.3897/PHARMACIA.69.E77353

Кузнецова В.С.✉, Синельникова В.А., Васильев А.В., Лосев Ф.Ф.

Действие веществ, потенциально усиливающих остеоиндуктивное действие BMP-2

ФГБУ НМИЦ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России, Москва, Россия

✉ tilia7@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты исследования симвастатина и пентоксифиллина — веществ, потенциально усиливающих остеоиндуктивное действие BMP-2. На модели крыс с овариэктомией в условиях состояний, провоцирующих развитие остеопороза, препараты не обладали остеоиндуктивным эффектом.

Ключевые слова: симвастатин; пентоксифиллин; BMP-2; регенерация костной ткани.

Kuznetsova V.S., Sinelnikova V.A., Vasilyev A.V., Losev F.F.

Effect of substances potentially enhancing BMP-2 osteoinductivity

Central Research Institute of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Moscow, Russia

Abstract. The results of the study of simvastatin and pentoxifylline, substances that may enhance the osteoinductive effect of BMP-2, are presented. The drugs had no osteoinductive effect in the ovariectomy rat model under conditions that induce osteoporosis.

Keywords: simvastatin; pentoxifylline; BMP-2; bone regeneration.

Лечение пациентов с остеопорозом является сложной задачей в стоматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии, поскольку метаболические нарушения обмена костной ткани приводят к ухудшению заживления костных дефектов и увеличению длительности послеоперационной реабилитации [1]. В связи с этим перспективным является поиск веществ, которые способствуют восстановлению нарушенных молекулярных и клеточных механизмов регенерации кости у больных с остеопорозом. Одним из них является костный морфогенетический белок-2 (BMP-2) — фактор роста, способствующий формированию костной ткани *de novo*. У пациентов с остеопорозом остеоиндуктор характеризуется сниженным уровнем экспрессии и его применение в составе костно-пластических материалов потенциально могло бы решить проблему заживления костных дефектов [2]. Однако по данным *in vitro* и *in vivo* исследований, применение экзогенного BMP-2 в условиях остеопороза может иметь низкую эффективность. Помимо этого, при использовании белка существуют сложности с подбором безопасных концентраций, которые не приводили бы к возникновению побочных эффектов. В тоже время исследования, касающиеся эффективности применения BMP-2 у лиц с остеопорозом в клинике, ограничены. В связи с этим ведется поиск веществ, которые способствовали бы усилению остеоиндуктивных свойств BMP-2 в условиях состояний, провоцирующих развитие остеопороза. Одними из них являются симвастин и пентоксифиллин, которые традиционно используются при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Так, *in vitro* было показано, что вещества способствуют остеогенной дифференцировке остеобластов, что позволяет предположить наличие у них свойств, способствующих остеогенезу [3, 4].

Целью исследования было изучение действия симвастатина и пентоксифиллина в условиях состояний, провоцирующих развитие остеопороза, *in vivo*.

У половозрелых самок крыс линии Wistar проводили овариэктомию. Группу контроля составляли ложнопериоперированные животные. Через 8 недель в обеих группах выполняли подкожную имплантацию желатиновой губки с растворами пентоксифиллина в концентрации 10 и 50 мг/мл и симвастатина в концентрации 0,5 и 10 мг/мл. Все эксперименты были выполнены с соблюдением биоэтических норм. Выведение животных

проводили на 14 сутки в CO₂-инкубаторе. После плановой эвтаназии выполняли забор зон имплантации материалов и передавали полученные некропаты на гистологическое исследование. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и по Массону с анилиновым синим.

При оценке способности веществ вызывать неоостеогенез, было показано, что вне зависимости от концентрации симвастатин и пентоксифиллин не обладали остеоиндуктивным действием как у крыс с овариоэктомией, так и у ложноперирированных крыс. На гистологических препаратах в 100% случаев отсутствовали очаги новообразованной костной ткани. Это свидетельствует о том, что пентоксифиллин и симвастатин в отсутствие BMP-2 не обладают остеоиндуктивным эффектом. В группах крыс с овариоэктомией имплантация симвастатина и пентоксифиллина вызывала схожий макрофагальный ответ — число макрофагов было незначительным. В то время как у ложноперирированных крыс имплантация пентоксифиллина сопровождалась выраженной макрофагальной инфильтрацией. В области имплантации пентоксифиллина в концентрации 50 мг/мл у ложноперирированных крыс отмечали выраженный ангиогенез — новообразованные сосуды различного диаметра пронизывали область имплантации губки. Полученный результат может свидетельствовать о том, что при имплантации пентоксифиллина в сочетании с BMP-2 за счет прорастания сосудов в области костного дефекта будут формироваться условия для доставки прогениторных клеток и их дальнейшей дифференцировки с формированием костной ткани.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что симвастатин и пентоксифиллин не обладают остеоиндуктивным эффектом. В связи с этим требуются дальнейшие исследования свойств веществ, а также молекулярных и клеточных механизмов, способствующих регенерации костной ткани при взаимодействии их с BMP-2, как в норме, так и в условиях состояний, провоцирующих развитие остеопороза.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-75-01116.

Список литературы

1. Chandran M., Akesson K.E., Javaid M.K., et al. Impact of osteoporosis and osteoporosis medications on fracture healing: a narrative review // *Osteoporos Int.* 2024. Vol. 35, N 8. P. 1337–1358. doi: 10.1007/s00198-024-07059-8
2. Kanakaris N.K., Petsatodis G., Tagil M., Giannoudis P.V. Is there a role for bone morphogenetic proteins in osteoporotic fractures? // *Injury.* 2009. Vol. 40, N S3. P. S21–S26. doi: 10.1016/S0020-1383(09)70007-5
3. Sabandal M.M.I., Schäfer E., Petsching S., et al. Pleiotropic effects on proliferation and mineralization of primary human adipose tissue-derived stromal cells induced by simvastatin // *Open Biol.* 2022. Vol. 12, N 6. ID 210337. doi: 10.1098/rsob.210337
4. Rawadi G., Ferrer C., Spinella-Jaegle S., et al. 1-(5-Oxohexyl)-3,7-dimethylxanthine, a phosphodiesterase inhibitor, activates MAPK cascades and promotes osteoblast differentiation by a mechanism independent of PKA 83activation (pentoxifylline promotes osteoblast differentiation) // *Endocrinology.* 2001. Vol. 142, N 11. ID 467382. doi: 10.1210/endo.142.11.8499

Кузнецова М.А. ✉, Борхунова Е.Н.

Стимуляция репаративного остеогенеза с помощью секрета ММСК

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина», Москва, Россия

✉ kuznetsova_mva@mail.ru

Аннотация. Микроскопическими методами показано, что секретом мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) при введении в костный дефект обеспечивает стимуляцию репаративного остеогенеза, более раннее по сравнению с контролем ремоделирование регенерата с восстановлением гистотипии.

Ключевые слова: секретом; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; репаративный остеогенез.

Kuznetsova M.A., Borkhunova E.N.

Stimulation of reparative osteogenesis with the help of the MMSC secretome

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Skryabin», Moscow

Abstract. Microscopic methods have shown that the secret of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) when injected into a bone defect provides stimulation of reparative osteogenesis, earlier remodeling of the regenerate with restoration of histotype compared with the control.

Keywords: secretome; multipotent mesenchymal stromal cells; reparative osteogenesis.

Стимуляция репаративной регенерации является важным биологическим эффектом клеточных продуктов, который хорошо известен в биологии и медицине [1]. Однако в настоящее время большой интерес представляет такая форма регенеративных препаратов, как секретом, или кондиционная среда ММСК, содержащая, в частности, комплекс провоспалительных и противовоспалительных цитокинов. Положительные эффекты секрета ММСК показаны при терапии кожных ран, дефектов роговицы, повреждении сухожилий [2–4], однако данные о влиянии этого препарата на репаративный остеогенез единичны [5]. В этой связи проведено исследование, цель которого — установить особенности репарации диафиза длинной трубчатой кости в условиях применения секрета ММСК. Работа проведена на белых беспородных крысах, самцы, 180 г, которых подразделяли на контрольную и опытную группы (по 20 животных в каждой). У всех животных под наркозом (Изофлуран) формировали односторонний несквозной дефект диафиза бедренной кости округлой формы, который орошали в опытной группе секретом ММСК, в контрольной — 0,9% р-ра NaCl. Повторное введение препаратов производили на 7-е сутки параоссально. Животных подвергали эвтаназии (Изофлуран) на 7, 14, 30 сутки, отбирали аутопсии для светомикроскопических исследований и изучения методом сканирующей электронной микроскопии, которые проводили по общепринятым методикам. Также осуществляли взятие крови на 7-е сутки для подтверждения стимуляции репаративного остеогенеза путем определения щелочной фосфатазы (ЩФ), кальция (Ca) и фосфора (P).

Исследования показали, что применение секрета ММСК к 7-м суткам стимулирует неоангиогенез в области заживления, на что указывает большее количество гемокapилляров в опытных образцах (5–10 гемокapилляров в поле зрения при $\times 400$ в опытной группе, 3–5 в контрольной). Усиленная перфузия

тканей, можно думать, способствует стимуляции репаративного остеогенеза, на которую указывают и результаты биохимических исследований крови: опытная группа опережала контрольную по показателям щелочной фосфатазы (234 ± 34 и 147 ± 17 Ед/л), фосфора ($3,13 \pm 0,32$ и $2,27 \pm 0,16$ ммоль/л). По содержанию кальция статистически достоверных различий не выявлено ($2,54 \pm 0,15$ и $2,53 \pm 0,13$ ммоль/л). Гистологические исследования позволили подтвердить активизацию репаративного остеогенеза: в опытной группе по сравнению с контрольной выявлено более раннее закрытие дефекта регенератом (к 14-м суткам). К 30-м суткам регенерат, сформированный в условиях применения секретома ММСК, имеет строение, близкое к гистотипическому: в структуре диафиза в области репарации преобладает пластинчатая костная ткань, наблюдаются наружная и внутренняя общие системы костных пластин, а также остеонный слой со вставочными костными пластинами. Это может свидетельствовать о более раннем remodelировании регенерата в опытной группе по сравнению с контрольной, что, в свою очередь, может определять и восстановление функциональной пригодности кости.

Полученные данные указывают на эффективность секретома ММСК как препарата, стимулирующего репаративный остеогенез, что открывает новые возможности для дальнейших фундаментальных исследований в области регенеративной медицины и позволяет совершенствовать схемы лечения пациентов с повреждениями костей.

Список литературы

1. Vizoso F.J., Eiro N., Cid S., et al. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine // *Int J Mol Sci*. 2017. Vol. 18, N 9. ID 1852. doi: 10.3390/ijms18091852
2. Борхунова Е.Н., Полябин С.В., Сароян С.В., Довгий А.И. Особенности репаративной регенерации роговицы в условиях применения секретома стволовых клеток // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2022. Т. 11, № 3. С. 45–55. EDN: SMDWQR doi: 10.31088/CEM2022.11.3.45-55
3. Качалин М.Д., Борхунова Е.Н., Полябин С.В., и др. Репаративная регенерация сухожилия под влиянием секретома мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток: экспериментальное исследование // *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2023. Т. 12, № 2. С. 77–88. EDN: KSFSNT doi: 10.31088/CEM2023.12.2.77-88
4. Борхунова Е.Н., Довгий А.И., Халил А. Особенности проявления клеточных взаимодействий на ранних этапах заживления раны кожи под влиянием секретома мезенхимальных стволовых клеток. В кн.: Сборник трудов Всероссийской (национальной) научно-практической конференции: «Морфология в XXI веке: теория, методология, практика»; 01–04 июня 2021, Москва. Москва: МВА имени К.И. Скрябина, 2021. С. 24–28.
5. Александрова С.А., Нащекина Ю.А., Надеждин С.В., и др. Остеоиндуктивные свойства секретома мезенхимных стволовых клеток человека, полученного с использованием системы для автоматического культивирования клеток // *Цитология*. 2020. Т. 62, № 4. С.238–249. EDN: TONSWW doi: 10.31857/S0041377120040021

Кузнецов Е.С.✉, Ветров М.А., Гатило Ю.Ю.

Цитопротективный эффект секретомы МСК в модели оксидативного стресса *in vitro*

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

✉ egorka_kuznetsov_96@list.ru

Аннотация. В работе показано наличие цитопротективного эффекта секретомы МСК, выражающегося в увеличении пролиферативной и миграционной активности клеток, в модели оксидативного стресса на культурах линейных фибробластов.

Ключевые слова: оксидативный стресс; фибробласты; секретомой МСК; цитопротективный эффект.

Kuznetsov E.S., Vetrov M.A., Gatilo Yu.Yu.

Cytoprotective effect of MSC secretome in an *in vitro* model of oxidative stress

FSBEU HE Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. The work shows the presence of a cytoprotective effect of the MSC secretome, expressed in an increase in the proliferative and migratory activity of cells, in a model of oxidative stress in linear cultures of fibroblasts.

Keywords: oxidative stress; fibroblasts; MSC secretome; cytoprotective effect.

Оксидативный стресс вызывает определенный интерес с точки зрения регенеративной биомедицины, так как он является одним из основных механизмов повреждения клеток и старения организма [1]. Исследования оксидативного стресса помогают создавать более эффективные методы терапии, способствующие улучшению регенерации поврежденных тканей. Одним из перспективных подходов к разработке способов применения клеточной терапии является использование секретомы МСК [2, 3].

Первичные культуры МСК жировой ткани мыши, полученные путем ферментативной дезагрегации коллагеназой, культивировались в среде DMEM с 10% эмбриональной телячьей сыворотки при 37°C и 5% CO₂. Для получения секретомы МСК, клетки на 3-м пассаже помещались в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч при комнатной температуре, после чего надосадочную жидкость фильтровали и центрифугировали.

Эмбриональные фибробласты мыши линии СЗНА высаживались в 24-луночные планшеты по 3×10⁴ клеток на лунку и культивировались в течение суток в стандартных условиях с добавлением полученного секретомы МСК (опыт) и без него (контроль). Оксидативный стресс индуцировали добавлением в культуральную среду раствора перекиси водорода (50 мкМ) на 3 часа.

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) в соответствии рекомендации производителя.

Для оценки миграционной активности клеток использовали scratch test (анализ на «застывание раны»).

Клетки опытной группы показали статистически достоверно более высокую в сравнении с контролем пролиферативную (на 38,17%) и миграционную (на 27,84%) активность. Полученные данные свидетельствуют в пользу наличия цитопротективного эффекта секретомы МСК в модели оксидативного стресса.

Список литературы

1. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine // *Redox Biol.* 2015. Vol. 4. P. 180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002
2. Mitchell R., Mellows B., Sheard J., et al. Secretome of adipose-derived mesenchymal stem cells promotes skeletal muscle regeneration through synergistic action of extracellular vesicle cargo and soluble proteins // *Stem Cell Res Ther.* 2019. Vol. 10, N 1. ID 116. doi: 10.1186/s13287-019-1213-1
3. Haque N., Widera D., Govindasamy V., et al. Extracellular vesicles from stem and progenitor cells for cell-free regenerative therapy // *Curr Mol Med.* 2022. Vol. 22, N 2. P. 120–131. doi: 10.2174/1566524021666210125114828

Кулебякина М.А. ✉, Бутузова Д.А., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.

Механизмы паракринного контроля дифференцировки фибробластов в миофибробласты мезенхимными стромальными клетками: роль растворимых белковых факторов

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Медицинский научно-образовательный институт, Москва, Россия

✉ kulebyakinama@my.msu.ru

Аннотация. В настоящее время активно изучаются антифибротические свойства мезенхимных стромальных клеток (МСК), однако роль растворимых белков секретомы МСК (РФ) мало исследована. Нами установлен механизм, по которому РФ препятствуют миофибробластной дифференцировке, опосредующей развитие фиброза тканей.

Ключевые слова: фиброз; мезенхимные стромальные клетки; протеомика; секретом; фибробласты; миофибробласты.

Kulebyakina M.A., Butuzova D.A., Basalova N.A., Efimenko A.Yu.

Mechanisms of paracrine control of differentiation of fibroblasts into myofibroblasts by mesenchymal stromal cells: the role of soluble protein factors

Medical Research and Educational Institute of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. At the moment, mesenchymal stromal cells (MSCs) antifibrotic properties are being actively studied, but the role of MSC secretome soluble proteins (SF) is unknown. We have shown a mechanism by which SFs prevent myofibroblast differentiation — the main cellular process in the development of fibrosis.

Keywords: fibrosis; mesenchymal stromal cells; proteomics; secretome; fibroblasts; myofibroblasts.

Мезенхимальные мультипотентные стволовые клетки (МСК) являются ключевыми регуляторами обновления и регенерации тканей. У человека преобладающим исходом заживления поврежденной ткани является образование рубца, или фиброзной ткани. Данный процесс осуществляется, главным образом, миофибробластами, образующимися преимущественно из резидентных фибробластов ткани под влиянием профибротических стимулов. Нарушение регуляции дифференцировки фибробластов в миофибробласты может привести к патологическому фиброзу — состоянию, при котором здоровая функциональная ткань чрезмерно разрушается и заменяется соединительной тканью. Недавно мы показали, что растворимые белки, секретруемые МСК, предотвращают дифференцировку фибробластов в миофибробласты [1], а также сравнили белковый состав фракции растворимых белков и тотальной фракции секретомы МСК методом полуколичественного протеомного анализа [2]. Мы обнаружили, что фракция растворимых белков секретомы МСК обогащена относительно общей фракции секретомы белками, способными регулировать в клетках-мишенях канонические сигнальные пути TGF- β , Wnt и Notch, и обеднена белками, способными активировать в клетках-мишенях сигнальный путь NF- κ B [2].

В настоящей работе мы исследовали механизмы действия указанных фракций секретомы МСК жировой ткани человека на *in vitro* дифференцировку человеческих фибробластов кожи в миофибробласты, запуская ее добавлением к клеткам рекомбинантного TGF- β 1. Методом ПЦР в реальном времени мы показали, что фракция растворимых белков секретомы МСК снижает базальный уровень экспрессии гена AXIN2,

транскрипционной мишени канонического сигнального пути Wnt, но не влияет на уровни экспрессии транскрипционных мишеней канонического сигнального пути TGF- β и Notch в фибробластах на ранних этапах (6 часов) в данной модели. Методом вестерн-блоттинга мы продемонстрировали, что данная фракция, но не тотальная фракция секрета МСК, снижает содержание в ядрах фибробластов бета-катенина, посредника канонического сигнального пути Wnt. Согласно данным протеомного анализа [2], среди белков, содержащихся во фракции растворимых белков секрета МСК, присутствует белок DKK3. Данные литературы свидетельствуют о том, что DKK3 может подавлять канонический сигнальный путь Wnt в клетках-мишенях [3, 4]. Мы удалили белок DKK3 из фракции растворимых белков секрета МСК методом иммунодеплеции и обнаружили, что это приводит к значимому снижению способности этой фракции как подавлять экспрессию гена AXIN2 в фибробластах, так и эффективно препятствовать дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Таким образом, фракция растворимых белков секрета МСК подавляет в фибробластах активацию сигнального пути Wnt и препятствует дифференцировке фибробластов в миофибробласты *in vitro*, при этом данные эффекты зависят от наличия в составе данной фракции белка DKK3.

Помимо этого, мы изучили влияние общей фракции секрета МСК, неспособной, по нашим данным, эффективно препятствовать *in vitro* дифференцировке фибробластов в миофибробласты, на активацию внутриклеточной сигнализации в клетках-мишенях. По данным протеомного анализа, данная фракция обогащена белковыми активаторами сигнального пути NF- κ B. Методом ПЦР в реальном времени генов-мишеней транскрипционного фактора NF- κ B, а также методом вестерн-блоттинга мы показали, что тотальная фракция, но не фракция выделенных растворимых белков секрета МСК, активирует сигнальный путь NF- κ B в фибробластах кожи человека в *in vitro* модели дифференцировки фибробластов в миофибробласты.

Полученные данные уточняют механизм антифибротического действия секрета МСК, а также указывают на необходимость контроля содержания в препаратах на основе секрета МСК компонентов, активирующих воспалительный сигнальный каскад.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда No. 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>.

Список литературы

1. Basalova N., Sagaradze G., Arbatskiy M., et al. Secretome of mesenchymal stromal cells prevents myofibroblasts differentiation by transferring fibrosis-associated microRNAs within extracellular vesicles // *Cells*. 2020. Vol. 9, N 5. ID 1272. doi: 10.3390/cells9051272
2. Kulebyakina M., Basalova N., Butuzova D., et al. Balance between pro- and antifibrotic proteins in mesenchymal stromal cell secretome fractions revealed by proteome and cell subpopulation analysis // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 25, N 1. ID 290. doi: 10.3390/ijms25010290
3. Zhai C.G., Xu Y.Y., Tie Y.Y., et al. DKK3 overexpression attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis in an angiotensin-perfused animal model by regulating the ADAM17/ACE2 and GSK-3 β / β -catenin pathways // *J Mol Cell Cardiol*. 2018. Vol. 114. P. 243–252. doi: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.018
4. Onai T., Takai A., Setiamarga D.H., Holland L.Z. Essential role of Dkk3 for head formation by inhibiting Wnt/ β -catenin and Nodal/Vg1 signaling pathways in the basal chordate amphioxus // *Evol Dev*. 2012. Vol. 14, N 4. P. 338–350. doi: 10.1111/j.1525-142X.2012.00552.x

Кулебякин К.Ю.^{1,2} ✉, Тюрин-Кузьмин П.А.¹, Волошин Н.С.¹, Усачев В.А.¹, Чечехин В.И.¹, Воронцова М.В.¹

Роль малых субпопуляций МСК в контроле обновления жировой ткани

¹ Кафедра биохимии и регенеративной биомедицины, МНОИ ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

✉ konstantin-kuleb@mail.ru

Аннотация. Малые функциональные субпопуляции клеток в составе МСК выполняют функцию регуляторов и «дирижируют» остальными клетками в популяции, определяя формирование новых белых или бежевых адипоцитов, а также синхронизируя ответы всей популяции МСК на гормон.

Ключевые слова: МСК; адипогенез; инсулиновый рецептор; ПТГ; норадреналин.

Kulebyakin K.Yu.^{1,2} ✉, Tyurin-Kuzmin P.A.¹, Voloshin N.S.¹, Usachev V.A.¹, Chechekhin V.I.¹ Vorontsova M.V.¹

Regulatory populations of MSC and their role in control of adipose tissue renewal

¹ Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Centre, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Small functional subpopulations of cells within MSCs act as regulators and “orchestrate” the rest of the cells in the population, determining the formation of new white or beige adipocytes, as well as synchronizing the responses of the entire MSC population to the hormone.

Keywords: MSC; adipogenesis; insulin receptor; PTH; noradrenaline.

В основе существования живых существ лежит гомеостаз — система скоординированных физиологических процессов, обеспечивающих поддержание большинства устойчивых состояний организма. Неотъемлемой частью гомеостаза является поддержание организменного баланса уровней питательных веществ и энергии — энергетический гомеостаз. Определяющую роль в контроле энергетического гомеостаза организма играет жировая ткань. Для того, чтобы в течение всей жизни жировая ткань могла подстраиваться под метаболические потребности организма она подвергается постоянному обновлению. 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. Большое количество работ 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. В 2018 Schwalie и соавт. 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. В наших работах нами было установлено, что для целого ряда гормонов

функциональный эффект на популяцию МСК реализуется как раз по данному механизму. В частности, мы смогли выделить малую субпопуляцию клеток, несущих на своей поверхности рецептор к инсулину. Несмотря на то, что инсулин является ключевым гормоном энергетического гомеостаза, менее 15% от общего числа МСК несут на своей поверхности рецептор к инсулину. При этом оказалось, что удаление этих клеток из популяции практически полностью лишает МСК способности дифференцироваться в клетки жировой ткани. 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, происходило полное восстановление способности к дифференцировке в адипоциты. Кроме инсулина, мы также обнаружили, что прямой ответ на гормон гомеостаза кальция — паратиреоидный гормон также формируется приблизительно в 20% клеток популяции МСК. Тем не менее данные клетки также продуцируют паракринные факторы, обеспечивающие единый функциональный ответ всей популяции на гормон. Аналогичные результаты были получены в нашем коллективе с воздействием гормона норадреналина, обеспечивающего формирование термогенных бежевых адипоцитов в жировой ткани.

Это позволяет предположить, что специализированные популяции клеток, чувствительные к определенным гормонам выполняют функцию регуляторов и «дирижируют» остальными клетками в популяции, определяя формирование новых белых или бежевых адипоцитов, а также синхронизируя ответы всей популяции МСК на гормон.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (проект № 19-75-30007).

Список литературы

1. Schwalie P.C., Dong H., Zachara M., et al. A stromal cell population that inhibits adipogenesis in mammalian fat depots // *Nature*. 2018. Vol. 559, N 7712. P. 103–108. doi: 10.1038/s41586-018-0226-8
2. Zachara M., Rainer P.Y., Hashimi H., et al. Mammalian adipogenesis regulator (Areg) cells use retinoic acid signalling to be non- and anti-adipogenic in age-dependent manner // *EMBO J*. 2022. Vol. 41. ID e108206. doi: 10.15252/embj.2021108206

Кулинич С.С.¹✉, Зафранская М.М.¹, Гаин Ю.М.²

Влияние трансформирующего фактора роста-β1 на активацию миогенного потенциала и антипролиферативные свойства мезенхимальных стромальных клеток *in vitro*

¹ Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины, Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

² Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

✉ bagatka_sv@mail.ru

Аннотация. В настоящей работе проведено исследование влияния трансформирующего фактора роста-β1 в среде культивирования на активацию миогенных путей дифференцировки мезенхимальных стромальных клеток, экспрессию генов миоспецифических маркеров и антипролиферативные свойства клеток.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; миогенная дифференцировка; трансформирующий фактор роста-β1; антипролиферативные свойства.

Kulinich S.¹, Zafranskaya M.¹, Gain Yu.²

Influence of transforming growth factor-β1 on myogenic potential activation and antiproliferative properties of mesenchymal stromal cells *in vitro*

¹ Scientific Research Institute of Experimental and Clinical medicine, Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. In this work we studied effect of transforming growth factor-β1 in the culture medium on activation of mesenchymal stromal cells myogenic differentiation pathways, myospecific marker genes expression and antiproliferative properties of cells.

Keywords: mesenchymal stromal cells; myogenic differentiation; transforming growth factor-β1; antiproliferative properties.

Получение культуры лейомиоцитов с целью применения в регенеративной медицине сопряжено с высокой инвазивностью процедуры забора гладкомышечной ткани, а также проблемой снижения сократительной активности клеток при экспансии *in vitro* по причине активации их перехода к секреторному фенотипу. В связи с этим актуален поиск более доступных альтернативных источников клеток, способных дифференцироваться в миогенном направлении и приобретать функциональную активность миоцитов гладких мышц. Одной из популяций клеток, обладающих миогенным потенциалом, является активно изучаемая популяция мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (ММСК). Большинство исследований, посвященных оценке миогенного потенциала ММСК, направлено на поиск индукторов миогенного пути дифференцировки клеток (трансформирующий фактор роста-β1 (*TGF-β1*), ингибитор МЕК-киназ, гепарин и др.) и доказательство их эффективности посредством определения экспрессии миоспецифических генов-маркеров. При этом остаётся без внимания влияние активаторов миогенной дифференцировки на иммуномодулирующие функции ММСК, играющие важную роль в реализации репаративных возможностей клеток.

Цель исследования: оценить изменение профиля экспрессии миоспецифических генов и антипролиферативные свойства ММСК в условиях стимуляции миогенного потенциала фактором *TGF-β1*.

Материалом для исследования являлись культуры МСК ($n = 12$), полученные путём энзиматического расщепления образцов подкожной жировой ткани здоровых доноров, оперированных по поводу абдоминопластики. Для активации миогенного потенциала клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 5 нг/мл $TGF-\beta 1$, 1% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 1% антибиотика, 1% L-глутамина в течение 6 дней. Интактные культуры МСК инкубировали в полной питательной среде DMEM с 10% ЭТС, 1% антибиотика и 1% L-глутамина. Жизнеспособность МСК подсчитывали в ходе окрашивания клеточной суспензии 0,4%-ным раствором трипанового синего. Исследование экспрессии генов-маркеров лейомиоцитов (трансгелин, кальпонин, миокардин и тяжёлые цепи миозина гладких мышц) в образцах интактных/дифференцированных культур проводили методом обратнo-транскриптазной ПЦР в режиме реального времени. Для оценки антипролиферативных свойств МСК дифференцированные клетки кокультивировали с окрашенными карбоксифлуоресцеином мононуклеарами периферической крови (МПК) здоровых доноров ($n = 10$) в соотношении 1:10 в полной культуральной среде RPMI (10% ЭТС, 1% антибиотика, 1% L-глутамина), содержащей неспецифический стимулятор пролиферации T-лимфоцитов — фитогемагглютинин (2,5 мкг/мл). Регистрацию количества пролиферирующих и непролиферирующих T-лимфоцитов на 6 сутки инкубации осуществляли методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклонального антитела CD3-PC7 (Beckman Coulter). При статистической обработке данных применяли критерий Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

В ходе микроскопического анализа роста клеточных культур в дифференцировочной среде выявлено преобладание фибробластоподобных клеток над клетками веретеновидной морфологии и увеличение плотности волокон цитоскелета. Жизнеспособность МСК при кокультивировании с $TGF-\beta 1$ сохранялась на высоком уровне, статистически значимо не отличаясь от данного показателя в интактных культурах (93 (89÷96)% и 96 (94÷98)%, соответственно).

В интактных МСК установлена конститутивная экспрессия гена гладкомышечного α -актина. Стимуляция миогенных путей дифференцировки в присутствии $TGF-\beta 1$ приводила к активации в МСК генов и других специфических маркеров дифференцировки/созревания гладкомышечных клеток: трансгелина, тяжелых цепей миозина гладких мышц, кальпонины и миокардина.

Проведена оценка количества пролиферирующих $CD3^+$ T-клеток в кокультурах МПК с интактными/дифференцированными МСК и в культурах МПК, стимулированных ФГА. В присутствии дифференцированных клеток процент пролиферирующих митоген-стимулированных T-лимфоцитов статистически значимо повышался по сравнению с показателем в кокультурах МПК с интактными МСК (75 (63÷81)% и 51 (43÷59)%, соответственно, $p < 0,05$), но не достигал значений процента пролиферации лимфоцитов в пробах со стимулированными ФГА МПК (92 (88÷94)%, $p < 0,05$).

Таким образом, использование $TGF-\beta 1$ в качестве индуктора миогенного потенциала МСК позволяет получить жизнеспособную культуру лейомиоцитоподобных клеток, экспрессирующих ряд генов специфических маркеров дифференцировки/созревания гладкомышечных клеток: гладкомышечного α -актина, трансгелина, тяжелых цепей миозина гладких мышц, кальпонины и миокардина. Несмотря на значительное снижение, антипролиферативные свойства МСК в процессе дифференцировки сохраняются, обуславливая способность миостимулированных культур подавлять пролиферацию и активность клеток адаптивного иммунитета при их практическом использовании в регенеративной медицине.

Кунеев И.К.¹ ✉, Корнилова А.И.¹, Петрова В.В.^{1,2}, Поникарова А.Н.^{1,2}, Нащекина Ю.А.¹, Домнина А.П.¹

Изменение тканеспецифического профиля экспрессии генов эндометриальных мезенхимных стромальных клеток человека при переходе к 3D-культивированию

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

✉ kynejev@gmail.com

Аннотация. Исследование посвящено сравнительному анализу профилей экспрессии генов мезенхимных стромальных клеток эндометрия человека при культивировании в различных условиях: в монослое, в виде сфероидов и в 3D-скаффолдах. Полученные результаты помогут в создании физиологичных клеточных моделей эндометрия.

Ключевые слова: 3D-культивирование; мезенхимные стромальные клетки; тканевая инженерия; эндометрий.

Kuneev I.K.¹, Kornilova A.I.¹, Petrova V.V.^{1,2}, Ponikarova A.N.^{1,2}, Nashchekina Yu.A.¹, Domnina A.P.¹

Alterations in tissue-specific gene expression profile of human endometrial mesenchymal stromal cells observed in 3D culture

¹ Institute of cytology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study is aimed at the comparative analysis of gene expression profiles of human endometrial mesenchymal stromal cells cultured under different conditions: in a monolayer, as spheroids and in 3D scaffolds. The results obtained will help in the design of physiologic cell models of the endometrium.

Keywords: 3D cell culture; mesenchymal stromal cells; tissue engineering; endometrium.

На протяжении XX века наряду с использованием животных моделей для изучения биологических процессов, протекающих в организме человека в норме и патологии, активно развивались подходы по использованию клеток человека, культивируемых *in vitro*, в качестве моделей для исследований. В последние несколько десятилетий большое значение приобрели трехмерные культуры клеток, позволяющие гораздо лучше воспроизводить структуру и функции исходных тканей, чем стандартные способы культивирования клеток в виде монослоя, а вместе с тем — получать более физиологичные данные. Было показано, что при переходе от стандартного 2D-культивирования на пластиковых подложках к 3D-системам клетки изменяют свой фенотип, в значительной степени определяемый профилем экспрессии их генов. В свою очередь, эти изменения отражаются на их способности выполнять функции, свойственные конкретным типам клеток в различных тканях. Особенно актуальна разработка функциональных клеточных моделей тех тканей человека, для изучения которых использование животных моделей затруднено. В частности, уникальность женской репродуктивной системы человека вынуждает использовать более сложные подходы к культивированию клеток для получения релевантных моделей *in vitro*.

В данной работе мы сравнивали профили экспрессии генов мезенхимных стромальных клеток эндометрия человека (ЭМСК) при различных способах культивирования:

- 1) в стандартных условиях клеточного монослоя;
- 2) в виде клеточных сфероидов;

3) в виде клеточных сфероидов, инкорпорированных в целлюлозный 3D-скаффолд. ЭМСК были выделены из элементов десквамированного эндометрия, содержащихся в менструальной крови [1]. Из ЭМСК методом висячей капли были сформированы клеточные сфероиды [2]. Далее полученные сфероиды были инкорпорированы в коллагенизированные целлюлозные скаффолды [3].

Определение уровней экспрессии генов проводили методом ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Для изучения были выбраны гены, важные для обеспечения нормальной работы функционального слоя эндометрия. В качестве контроля для сравнения использовались участки эндометрия человека, полученные из менструальной крови тех же доноров.

Как известно, основной функцией эндометрия — внутреннего слизистого слоя матки, является поддержание наступления и развития беременности на всех этапах. Важным процессом, предшествующим имплантации эмбриона, является децидуализация клеток эндометрия. Общепринятыми маркерами данного процесса являются повышенные уровни экспрессии генов PRL (пролактина) и IGFBP1 (инсулиноподобный фактор роста связывающего белка-1). Нами было обнаружено, что экспрессия PRL возрастает в трехмерных культурах ЭМСК по сравнению с монослойной культурой, приближаясь к уровню, наблюдаемому в нативном эндометрии. Другой маркер децидуальной дифференцировки, IGFBP1, демонстрирует подобный тренд.

Некоторыми исследователями отмечено увеличение экспрессии проангиогенных VEGF и VEGFR2 в эндометрии при децидуализации [4]. В этом контексте интересно, что ЭМСК при переходе к 3D-культивированию демонстрируют заметно более высокий уровень экспрессии VEGF и VEGFR2, чем при культивировании в монослое, что удалось выяснить в ходе настоящего исследования. Также нами было показано, что переход ЭМСК в каждую из трех исследованных культур приводит к повышению уровней экспрессии TNFAIP6 и HGF, являющихся ключевыми в приобретении ЭМСК противовоспалительного и антифибротического фенотипа.

Кроме того, нами были определены уровни экспрессии генов рецепторов к эстрогенам (ESR1) и прогестерону (PGR), важных для пролиферации и функционирования эндометрия в течение менструального цикла. Было обнаружено значительное снижение уровня экспрессии гена эстрогенового рецептора ESR1 в ЭМСК в монослое и исследуемых трехмерных системах культивирования в сравнении с исходной тканью. При этом, в экспрессии гена прогестеронового рецептора PGR не наблюдалось значимых отличий между группами.

Таким образом, было установлено, что 3D-культуры ЭМСК на основе сфероидов характеризуются повышенным уровнем экспрессии генов — маркеров децидуализации, что косвенно свидетельствует об их коммитировании к децидуальной дифференцировке или же появлению субпопуляций децидуально дифференцированных клеток при переходе к 3D-культивированию. Также отмечено, что при переводе в культуру у ЭМСК снижается уровень экспрессии гена рецептора к эстрогенам (ESR1) по сравнению с нативной тканью вне зависимости от способа культивирования, и не изменяется уровень экспрессии гена рецептора к прогестерону (PGR).

Полученные результаты важно учитывать при создании трехмерных клеточных моделей эндометрия человека *in vitro*. Это необходимо для эффективного развития персонализированного подхода к лечению заболеваний в области гинекологии и репродуктологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 22-74-10126.

Список литературы

1. Земелько В.И., Гринчук Т.М., Домнина А.П., и др. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека // Цитология. 2011. Т. 53, № 12. С. 919–928. EDN: OJSWZB
2. Domnina A., Alekseenko L., Kozhukharova I., et al. Generation of therapeutically potent spheroids from human endometrial mesenchymal stem/stromal cells // J Pers Med. 2021. Vol. 11, N 6. ID 466. doi: 10.3390/jpm11060466
3. Кунеев И.К., Иванова Ю.С., Нащекина Ю.А., и др. Разработка метода трехмерного культивирования мезенхимных стволовых (стромальных) клеток человека с использованием матрицы из целлюлозы // Цитология. 2023. Т. 65, № 2. С. 170–180. EDN: LWOREJ doi: 10.31857/S0041377123020037
4. Guo X., Yi H., Li T.C., et al. Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human embryo Implantation: Clinical Implications // Biomolecules. 2021. Vol. 11, N 2. ID 253. doi: 10.3390/biom11020253

Куралесова А.И. ✉, Пронин А.В., Грошева А.Г., Генкина Е.Н.

А.Я. Фриденштейн: Открытие стволовых стромальных клеток

ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

✉ alla.kuralesova@yandex.ru

Аннотация. Исполнилось 100 лет со дня рождения выдающегося ученого А.Я. Фриденштейна — открывателя мезенхимальных стволовых стромальных клеток (МСК), основателя концепции кроветворного и лимфоидного микроокружения органов гемо- и лимфопоэза.

Ключевые слова: А.Я. Фриденштейн; стволовые стромальные клетки; МСК; колониеобразование; дифференцировка.

Kuralesova A.I., Pronin A.V., Grosheva A.G., Genkina E.N.

A.Ya. Friedenstein: the discovery of stromal stem cells

N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. It is the 100th anniversary of the birth of the outstanding scientist A.Ya. Friedenstein, the discoverer of mesenchymal stromal stem cells (MSCs), the founder of the concept of hematopoietic and lymphoid microenvironment of hemo- and lymphopoiesis organs.

Keywords: A.Ya. Friedenstein; stem stromal cells; MSCs; colony formation; differentiation.

В июне 2024 года исполнилось 100 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, члена-корреспондента АМН СССР Александра Яковлевича Фриденштейна — выдающегося ученого, медика, гистолога, иммунолога. Медицинское образование Александра Яковлевича началось в Военно-медицинской Академии в 1941 г., а продолжилось в Московском медицинском институте МЗ РСФСР. Его руководителями на кафедре гистологии, а позже в аспирантуре были известные гистологи А.В. Румянцев и А.Н. Студичкий. Результаты, полученные при выполнении работы, позволили ему защитить кандидатскую диссертацию «Гистогенез висцерального скелета высших позвоночных» в 1950 году. Дальнейшая его деятельность продолжилась в НИИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи АМН СССР в должности младшего научного сотрудника в Отделе специфической профилактики и терапии туберкулеза (руководитель проф. А.И.Тогунова) и была посвящена разработке методов прививки БЦЖ. По результатам продолжавшегося сотрудничества с кафедрой гистологии Московского медицинского института им была защищена докторская диссертация «Гистологический анализ внескелетного остеогенеза», в которой впервые были приведены четкие доказательства существования двух категорий остеогенных клеток-предшественников: детерминированных в костном мозге и индуцибельных в мезенхимальной строме и подкожной соединительной ткани. В монографии «Индукция костной костной ткаги и остеогенез2 (1973 г.) было обсуждено практическое значение этих данных. В 1955 г. А.Я. Фриденштейн перешел на работу в Отдел радиационной иммунологии, основанном в связи с активным использованием мирного атома и проведением испытаний ядерного оружия. Руководил отделом академик В.Л. Троицкий. Этот переход определил тематику дальнейших исследований: изучение естественного иммунитета у облученных животных. В 1963 г. в отделе была создана лаборатория иммуноморфологии, которую в последующие 25 лет возглавлял А.Я. Фриденштейн. В это же время он читал лекции по иммуноморфологии студентам кафедры гистологии МГУ им. М.В. Ломоносова. Большая эрудиция, неординарный ум, оригинальность мышления привлекали в аудиторию и студентов, и преподавателей. А.Я. Фриденштейн — один из организаторов Клуба иммунологов, созданного директором Института академиком О.В. Барояном, кузницы когорты будущих руководителей науки. Он посещал научные семинары

математика И.М. Гельфанда, на которые для обсуждения приглашались ведущие биологи, математики. В 1967 г. А.Я. Фриденштейну было присвоено звание профессора. Увлечение работами И.И. Мечникова и А.А. Максимова, которые как полагал А.Я. Фриденштейн, создали на грани XX века новое научное направление «иммуноморфология», которое определило направленность исследований Александра Яковлевича: изучение гистогенетических отношений между клетками стромы и репопулирующими на них кроветворными и лимфоидными клетками. Первый ответ был получен на модели гетеротопной трансплантации костного мозга, фрагменты которого, помещенные под капсулу почки сингенным мышам, формировали кость с костным мозгом, а аллогенным мышам — подвергались резорбции. Методом повторных трансплантаций костного мозга с использованием межлинейных гибридов был проведен дискриментный анализ принадлежности стромальной ткани костного мозга. Эти пионерские работы А.Я. Фриденштейна и его коллег показали, что стромальные клетки способны к длительному самоподдержанию и являются самостоятельной независимой от кроветворной линией клеток [1]. Вывод был подтвержден на моделях толерантных животных и радиационных химер [2], а результаты о независимости стромальных клеток от лимфоидных элементов были получены при гетеротопной трансплантации лимфатических узлов. Существенный этап исследования обусловлен разработанным Р.К. Чайлахяном методом визуализации стромальных клеток костного мозга, получением клонов стромальных клеток костного мозга *in vitro* и моноклональных диплоидных штаммов [3, 4]. Эти методы получили широкое международное признание. С помощью хромосомных маркеров и по данным типирования клеток по изоантигенам было доказано, что дискретные колонии фибробластов (МСК) являются клонами. При обратной трансплантации штаммов этих клеток формируется 4 типа тканей: костная, хрящевая, ретикулярная, жировая. Были исследованы пролиферативные и дифференцировочные потенции МСК, количественное содержание их в органах в норме, при патологии и при облучении, взаимодействии с антигенами, с кроветворными и лимфоидными клетками. Способность штаммов к самоподдержанию при сохранении диплоидности позволили перейти к приоритетному применению МСК в клинике — апофеоз деятельности А.Я.Фриденштейна. Им создана концепция кроветворного микроокружения, которая представлена в 6 монографиях. В 1987 г. А.Я. Фриденштейн был избран членом-корреспондентом Академии медицинских наук СССР. Имя А.Я. Фриденштейна открывателя мезенхимальных стволовых стромальных клеток вошло в историю науки. Школа исследователей стволовых стромальных клеток продолжает дело А.Я. Фриденштейна, векторами жизни которого были Наука и Радость поиска.

Список литературы

1. Friedestein A.J., Petrakova K.V., Kuralesova A.I., Frolova G.P. Heterotopic transplants of bone marrow // *Transplantation*. 1968. Vol. 6, N 2. P. 230–248. doi: 10.1097/00007890-196803000-00009
2. Friedestein A.J., Kuralesova A.I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras // *Transplantation*. 1971. Vol. 12, N 2. P. 99–108. doi: 10.1097/00007890-197108000-00001
3. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки // *ДАН СССР*. 1969. Т. 187, № 2. С. 473–479.
4. Friedestein A.J., Chailakhyan R.K., Lalykina K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells // *Cell Prolif.* 1970. Vol. 3, N 4. P. 393–403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

Курбанов Д.С.¹ ✉, Неофитов И.С.¹, Билялов А.И.^{1,2}, Филатов Н.С.¹, Титова А.А.¹, Шагимарданова Е.И.³, Гусев О.А.³, Киясов А.П.¹

Оценка регенерации эластического хряща игольчатых мышей *Acomys cahirinus* трёх возрастных групп

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² ГБУЗ «Московский клинический научный центр им. А.С. Логинова ДЗМ», Москва, Россия

³ ООО Научный центр «ЛИФТ», Москва, Россия

✉ kurbanovdavid9@gmail.com

Аннотация. Поставлена цель — оценить возможность регенерации трёх возрастных групп игольчатых мышей *Acomys*. Для проверки выбран формат панч-биопсии с дефектом радиусом 3 мм. После производства подсчеты закрытия радиуса дефекта на каждый из выбранных дней, в конце — забор материала с гистологическим исследованием.

Ключевые слова: *Acomys*; ушная раковина; регенерация.

Kurbanov D.S.¹, Neofitov I.S.¹, Bilyalov A.I.^{1,2}, Filatov N.S.¹, Titova A.A.¹, Shagimardanova E.I.³, Gusev O.A.³, Kiyasov A.P.¹

Assessment of elastic cartilage regeneration in *acomys cahirinus* needle mice of three age groups

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² GBUZ "Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov DZM", Moscow, Russia

³ LLC "LIFT", Moscow, Russia

Abstract. The aim of the study is to investigate the possibility of *Acomys* needle mouse regeneration. For this purpose, we selected the punch biopsy method for testing in three age groups, with a defect of 3 mm in radius. After that, we calculated the closure of the defect's radius for each of the selected days, and finally, we took the material for histological examination.

Keywords: *Acomys*; auricle; regeneration.

Онтогенетические изменения регенеративного потенциала были описаны для нескольких видов животных, эмбрионы, личинки и молодые представители многих видов обладают большим потенциалом для восстановления тканей, чем взрослые особи. Лягушки и мыши, например, способны к регенерации кожи на ранних этапах жизни, но теряют эту способность позже в процессе развития, в то время как аксолотли сохраняют способность к регенерации кожи даже после метаморфоза.

Одним из немногих представителей млекопитающих, которые способны восстанавливать обширные повреждения кожных покровов без развития фиброза, является мышь рода *Acomys*. Целью данного исследования являлось изучение механизмов, скорости и качества регенерации у трех возрастных групп иглистых мышей [1].

Эксперимент проведен на трех возрастных группах самок мышей *Acomys cahirinus*: до полового созревания (1 месяц жизни), в период полового созревания (3 месяц жизни), после полового созревания (7 месяц жизни) — которым был смоделирован хирургический дефект ушной раковины, при помощи панч-биопсии (диаметр дефекта 3 мм / последующее удаление округлого дефекта ушной раковины).

С помощью макروفотосъемки, с подсчетом площади дефектов, производили оценку регенеративной способности на 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 сутки. Забор материала произвели на 28 сутки с последующей парафинизацией и гистологическим исследованием.

К 14 суткам у всех трех групп мышей наблюдались процессы репаративной регенерации краев раны. К 28 суткам дефект ушной раковины был полностью, либо частично, закрыт одинаково у всех возрастных групп. 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.

Таким образом, у мышей *Acomys cahirinus* возрастной фактор не влияет на скорость и состояние репаративного гистогенеза эластического хряща.

Список литературы:

1. Билялов А.И., Филимошина Д.Д., Филатов Н.С., и др. У мышей рода *Acomys* после травмы восстанавливается эластический хрящ ушной раковины // Гены и Клетки. 2022. Т. 17, № 1. С. 42–47. EDN: EKHSUG doi: 10.23868/202205003

Куркова К.И.¹ ✉, Тверье Е.А.¹, Карпов Д.С.², Соловьева Е.В.¹, Пантелеев А.А.^{1,3}

Использование методов Cre-Lox-рекомбинации и CRISPR/Cas9 для получения эпидермальных кератиноцитов с нокаутом по гену Hif1 α

¹ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгарда, Москва, Россия

³ Институт хирургии им. А.В. Вишневского», Москва, Россия

✉ kurkova_kristina2000@mail.ru

Аннотация. В работе использованы методы геномного редактирования Cre-Lox (*in vivo*, лабораторные мыши) и CRISPR/Cas9 (*in vitro*, клетки HaCaT) для получения кератиноцитов, нокаутных по гену HIF1 α в кератиноцитах.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9; Cre-Lox-рекомбинация; Hif1 α ; HaCaT; филаггрин; цитокератин 14; лорикрин.

Kurkova K.I.¹, Tverye E.A.¹, Karpov D.S.², Solovieva E.V.¹, Panteleyev A.A.^{1,3}

Cre-Lox and CRISPR/Cas9 genome editing for generation of HIF1 α knock-down keratinocytes

¹ NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

³ Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. The Cre-Lox and CRISPR/Cas9 genome editing was used to knock-down the transcription factor HIF1 α in the primary epidermal and HaCaT keratinocytes

Keywords: Cre-Lox; CRISPR/Cas9; Hif1 α ; filaggrin; cytokeratin14; loricrin; HaCaT.

Сигнальный каскад HIF1 (Hypoxia Inducible Factor 1) является основным механизмом, обеспечивающим функционирование клеток в условиях гипоксии в норме и при различных патологиях, включая заболевания, связанные с нарушением дифференцировки и пролиферации кератиноцитов кожи [1]. В работе использована система Cre-Lox, которая позволяет осуществлять точный контроль над экспрессией генов и генетической модификацией *in vivo*, а также технология геномного редактирования *in vitro* CRISPR/Cas9, для инактивации гена HIF1 α — ключевого элемента транскрипционного комплекса HIF1. В качестве объекта исследования использовали культуру первичных кератиноцитов мышей K14-Cre/Hif1a^{flox/flox} и спонтанно иммортализованную линию кератиноцитов человека HaCaT, широко используемую для изучения процессов, связанных с дифференцировкой клеток эпидермиса кожи человека. Линия кератиноцитов K14-Cre/Hif1a^{flox/flox} была выделена из эпидермиса K14-Cre/Hif1a^{flox/flox} мышей с нокаутом по гену Hif1a под СК14 промотером, полученных при скрещивании трансгенных линий K14-Cre и Hif1a^{flox/flox}. Систему CRISPR/Cas9 использовали в виде плазмидного вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), полученного из некоммерческого репозитория плазмид Addgen (<https://www.addgene.org>). PX458 кодирует Cas9, соединённый с репортерным белком eGFP под контролем сильного конститутивного промотера pCMV и структурную часть направляющей/гидовой РНК под контролем промотера U6. Спейсеры системы клонировали в PX458 в виде отоженных двухцепочечных олигонуклеотидов по сайтам рестриктазы BSTV2I (изошизомер BbsI). В клонировании использовали следующие олигонуклеотиды: Hif1a1f (5'-CACCGCTCCATGTAACCTAATTAC-3') и Hif1a1r (5'-AAAACGTAATTAAGTTACATGGAG-3') — кодирующие спейсер g1РНК (5'-CTCCATGTAACCTAATTAC-3');

Hif1a2f (5'-CAC-CGCTCGAGATGCAGCCAGATC-3') и Hif1a2r (5'-AAAACGATCTGGCTGCATCTCGAG-3') — кодирующие спейсер g2PHK (5'-CTCGAGA-TGCAGCCAGATC); Hif1a3f (5'-CACC-GCCATCAGCTATTTGCCGTGTG-3') и Hif1a3r (5'-AAAACCCACACGCAAATAGCTGATG-G-3') — кодирующие спейсер g3PHK (5'-CCATCAGCTATTTGCCGTGTG-3'); Hif1a4f (5'-CACCGCTTTATATTGTGATGTAC-3') и Hif1a4r (5'-AAAACGTACATATCACAATAT-AAAG-3') — кодирующие спейсер g4PHK (5'-CTTTATATTGT-GATATGTAC-3'). В результате были получены 4 плазмиды с гидовыми РНК (g1PHK, g2PHK, g3PHK, g4PHK), нацеливающие систему CRISPR/Cas9 на разные участки второго экзона гена *HIF1α*. После трансфекции плазмидами системы CRISPR/Cas9 выделена линия, содержащая замены и короткие делеции в гене *HIF1α*. Иммуногистохимический анализ в линиях кератиноцитов K14-Cre/Hif1a^{lox/lox} и NaCaT^{ΔHIF1α} выявил отсутствие ядерной локализации HIF1α в условиях острой гипоксии (трехчасовая экспозиция 1%O₂). В условиях острой гипоксии выявлена активация экспрессии гена, кодирующего цитокератин 14 (СК14) — маркера базальных кератиноцитов, обеспечивающего формирование кератиноцитарного пласта и прикрепление его к базальной мембране как в нормальных, так и в нокаутных кератиноцитах, а также в NaCaT^{ΔHIF1α}. Отмечено изменение экспрессии гена, кодирующего маркер терминальной дифференцировки — лорикрина в линиях кератиноцитов K14-Cre/Hif1a^{lox/lox} и отсутствие влияния нокаута на экспрессию филаггрина (FLG — Filament Aggregating Protein), основного белка терминальной дифференцировки кератиноцитов в NaCaT^{ΔHIF1α}.

Список литературы

1. Coulombe P., Kerns M., Fuchs E. Epidermolysis bullosa simplex: a paradigm for disorders of tissue fragility // J Clin Invest. 2009. Vol. 119, N 7. P. 1784–1793. doi: 10.1172/JCI38177

Куровский Е.Б.✉, Гусев К.О., Грехнёв Д.А., Новикова Ю.В., Скобелева К.В., Глушанкова Л.Н., Вигонт В.А., Казначеева Е.В.

Взаимовлияние кальциевой сигнализации и провоспалительного пути STING

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ kursev24@yandex.ru

Аннотация. Используя методы иммуноблоттинга и флуоресцентного кальциевого имиджинга мы оценили взаимовлияние рецептора врожденного иммунитета STING и системы кальциевой сигнализации, ассоциированной с белком STIM1 в клеточной линии HEK293.

Ключевые слова: кальциевая сигнализация; депо-управляемый вход кальция; cGAS-STING; STIM1; SOCE; ИПСК модели.

Kurovsky E.B., Gusev K.O., Grekhnev D.A., Novikova I.V., Skobeleva K.V., Glushankova L.N., Vigont V.A., Kaznacheeva E.V.

The reciprocal regulation of calcium signaling and the pro-inflammatory STING pathway

Institute of cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Using Western blot analysis and fluorescent calcium imaging, we evaluate the reciprocal regulation of innate immunity receptors STING and calcium signaling associated with the STIM1 protein in the HEK293 cell line.

Keywords: calcium signaling; store-operated calcium entry; cGAS-STING; STIM1; SOCE; iPSC-based models.

cGAS-STING является сенсором цитозольной ДНК, появление которой может быть обусловлено вирусными и бактериальными инвазиями, а также процессами туморогенеза и нейродегенерации. Активация cGAS-STING пути запускает продукцию интерферонов I типа, что является важной составляющей системы врожденного иммунитета. Аберрантная передача сигналов cGAS-STING вовлечена в процессы онкогенеза и нейродегенерации. Ионы кальция являются универсальным вторичным посредником в передаче внутриклеточного сигнала и обеспечивают регуляцию большинства клеточных функций. Нарушения кальциевой сигнализации ассоциированы с аутоиммунными, онкологическими, нейродегенеративными заболеваниями и воспалительными процессами. Показано, что изменение концентрации кальция в цитозоле и эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) регулирует активность cGAS-STING пути. Недавним достижением стало открытие прямого белок-белкового взаимодействия между STIM1 и STING в мембране ЭР. STIM1 является сенсором концентрации кальция в ЭР и известным активатором депо-управляемых кальциевых (SOC) каналов. Таким образом, возможно, что взаимодействие STIM1-STING является бутылочным горлышком во взаиморегуляции активности STING и SOC-каналов, что может лежать в основе взаимовлияния нарушений кальциевого гомеостаза и развития воспалительных процессов при патологиях. Цель исследования заключается в выявлении взаимовлияния STIM1-STING зависимых сигнальных путей. На клеточной линии HEK293 мы оценили взаимовлияние количества белков STIM1/STING на вход кальция через SOC-каналы и динамику активации STING. Мы показали, что гиперэкспрессия STIM1 приводит к замедлению активации STING, а гиперэкспрессия STING снижает приток кальция через SOC-каналы. Предварительная фармакологическая активация STIM1 тапсигаргином антагонистически влияет на активацию STING пути в клеточной

линии HEK293. Также и преактивация STING с помощью diABZI уменьшает депо-управляемый вход кальция. Поскольку cGAS-STING вовлечен в патогенез болезни Паркинсона (БП) дальнейшая работа была направлена на выявление aberrантного взаимовлияния STIM1-STING в дофаминергических нейронах, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, специфичных для пациентов с БП, ассоциированной с мутацией в гене *LRRK2*. В данной модели мы наблюдали нарушение кальциевой сигнализации и увеличение экспрессии STING. Таким образом, белок-белковое взаимодействие STIM1-STING отражается как на кальциевом гомеостазе, так и на активации провоспалительного пути STING, а нарушения в одном из данных путей, очевидным образом, приводят к сбоям в работе другого пути, что необходимо учитывать при разработке лекарств против заболеваний, в патогенез которых вовлечена STIM1-STING зависимая сигнализация.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-44-00054.

Лазарев Р.Е.¹ ✉, Монакова А.О.^{1,2}, Басалова Н.А.^{1,2}, Попов В.С.^{1,2}, Ефименко А.Ю.^{1,2}

МикроРНК-21 опосредует способность мезенхимных стромальных клеток паракринно стимулировать продукцию тестостерона клетками Лейдига

¹ Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ rlazarev429@gmail.com

Аннотация. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) восстанавливают нишу сперматогониальных стволовых клеток, включая функцию клеток Лейдига, за счет паракринных механизмов. В работе выявлена ключевая роль компонента секретомы МСК микроРНК-21 в стимуляции секреции тестостерона клетками Лейдига.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; секретом; микроРНК-21; клетки Лейдига; тестостерон; ниша; сперматогониальная стволовая клетка; стероидогенез; внеклеточные везикулы.

Lazarev R.E.¹, Monakova A.O.^{1,2}, Basalova N.A.^{1,2}, Popov V.S.^{1,2}, Efimenko A.Yu.^{1,2}

MiR-21 mediates the ability of mesenchymal stromal cells to paracrine stimulation of testosterone production by Leydig cells

¹ Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSC) restore the niche of spermatogonial stem cells, including the function of Leydig cells, by paracrine mechanisms. The study revealed the key role of miR-21, the component of MSC secretome, in stimulation of testosterone secretion by Leydig cells.

Keywords: mesenchymal stromal cells; secretome; miR-21; Leydig cells; testosterone; niche; spermatogonial stem cell; steroidogenesis; extracellular vesicles.

В постнатальном периоде развития резидентные стволовые клетки играют важнейшую роль в поддержании самообновления и регенерации тканей и органов. Функционирование стволовых клеток обеспечивается специфическим микроокружением, называемом нишей стволовой клетки. Ключевыми поддерживающими клетками ниши являются мезенхимные стромальные клетки (МСК). Ранее нами было показано регенераторное воздействие МСК на нишу сперматогониальной стволовой клетки (ССК), в первую очередь, на поддерживающие сперматогенез клетки Лейдига, продуцирующие тестостерон, при этом эти эффекты МСК опосредованы в значительной степени действием комплекса секретлируемых факторов (секретомом). В состав секретомы МСК входят различные факторы роста, цитокины и элементы внеклеточного матрикса. Помимо растворимых компонентов, одной из важнейших составляющих секретомы МСК являются молекулы, переносимые в составе внеклеточных везикул (ВВ). ВВ содержат биологически активные вещества: растворимые белки, мРНК, некодирующие регуляторные РНК, включая микроРНК, окружённые билипидной мембраной. Важным компонентом в составе везикул МСК для стероидогенеза в нише ССК может являться микроРНК-21, поскольку есть опубликованные данные о роли микроРНК-21 в стероидогенезе ооцитов [1]. Однако роль микроРНК-21 в регуляции секреции тестостерона клетками Лейдига — ключевыми поддерживающими клетками ниши ССК, остаётся неясной.

Клетки Лейдига были выделены из семенников мышей и крыс по отработанной ранее методике. Затем было проведено моделирование снижения уровня продукции тестостерона клетками, депривированными в пустой среде DMEM с низкой глюкозой со временем культивирования, таким образом формируя контроль 2 дня (положительный контроль) и контроль 4 дня (отрицательный контроль). МСК были выделены из жировой ткани относительно здоровых молодых доноров, после культивирования до 4–5 пассажей наработан секретом этих клеток. К клеткам Лейдига добавляли либо мимик микроРНК-21 (с использованием неспецифической малой интерферирующей РНК в качестве контроля) с трансфекцией липофектаминоном, либо секретом МСК, либо секретом МСК с ингибитором микроРНК-21 (с использованием неспецифического контроля ингибитора). Через 48 часов после нанесения образцы собирали и измеряли в них концентрацию тестостерона методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Было показано, что добавление к клеткам Лейдига секрета МСК приводит к значимому увеличению синтеза тестостерона. Однако при добавлении к секрету МСК ингибитора микроРНК-21 наблюдаемый стимулирующий эффект снижается. При трансфекции клеток Лейдига мимиком микроРНК-21 концентрация тестостерона увеличивалась более чем в два раза, по сравнению с отрицательным контролем и контролем с трансфекцией малой интерферирующей РНК. При этом эффект стимулирования синтеза тестостерона при трансфекции микроРНК-21 на клетки Лейдига менее выражен по сравнению с эффектом при добавлении секрета МСК.

Таким образом, данные результаты исследования позволяют утверждать, что микроРНК-21 оказывает влияние на стероидогенез в клетках Лейдига, что приводит к стимуляции выработки тестостерона. Данный эффект реализуется как при добавлении мимика микроРНК-21, так и, по-видимому, микроРНК-21 в составе секрета МСК. Более выраженный эффект секрета МСК позволяет предполагать участие других компонентов секрета МСК в регуляции стероидогенеза, что требует дальнейшего изучения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>.

Список литературы

1. Chen L.-Y., Kao T.-W., Chen C.-C., et al. Frontier review of the molecular mechanisms and current approaches of stem cell-derived exosomes // *Cells*. 2023. Vol. 12, N 7. ID 1018. doi: 10.3390/cells12071018

Лапина Е.С.¹ ✉, Соловьев Д.А.^{1,2}, Александер-Синклер Э.И.¹

Разработка биосовместимого бесклеточного коллагенового гидрогелевого раневого покрытия, несущего антисептические препараты

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

✉ lapina.es@edu.spbstu.ru

Аннотация. Данная работа посвящена разработке коллагеновых гидрогелевых раневых покрытий, несущих антисептики и исследованию их биосовместимости в условиях *in vitro*. В работе исследовали влияние мирамистина, хлоргексидина, повидон-йода и фурацилина на клеточную составляющую БЭК «Эквивалент Дermalный ЭД».

Ключевые слова: гидрогелевые коллагеновые раневые покрытия; биосовместимость; антисептические препараты; эквиваленты кожи.

Lapina E.S.¹, Soloviev D.A.^{1,2}, Alexander-Sinclair E.I.¹

Development of a biocompatible cell-free collagen hydrogel wound dressing carrying antiseptic drugs

¹ Institute of cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. This work is devoted to the development of collagen hydrogel wound dressings carrying antiseptic drugs and the study of their biocompatibility *in vitro*. The effects of miramistin, chlorhexidine, povidone-iodine and furacilin on the cellular component of the BSE “Equivalent Dermal ED” were investigated.

Keywords: hydrogel collagen wound dressings; biocompatibility; antiseptic drugs; skin equivalents.

В наши дни для заживления кожных ран используют различные стратегические подходы, однако, большинство методов лечения ран основано на их перевязке. Различные раневые покрытия (РП) активно применяют для защиты ран от дальнейшего повреждения, инфицирования и ускорения заживления [1]. В зависимости от взаимодействия с раной РП разделяют на пассивные и активные, которые, в свою очередь, делят на интерактивные и биоактивные [2]. Интерактивные РП воздействуют на область раны, поддерживая процесс регенерации: они удаляют лишнюю жидкость, создают влажную среду с оптимальным уровнем pH, облегчают газообмен и предотвращают бактериальную инфекцию [3]. Биоактивные РП содержат биоактивные компоненты, которые ускоряют процесс заживления. К биоактивным РП относят в том числе и тканевые (биоинженерные эквиваленты кожи, БЭК) с клеточной составляющей или без нее [2]. Интерактивные РП на основе природных полимеров могут проявлять биологическую активность и определяются как интерактивные/биоактивные РП [3]. Среди материалов для интерактивных/биоактивных РП особое место занимает коллаген благодаря своим уникальным структурным свойствам, которые имитируют внеклеточный матрикс и обеспечивают основу для загрузки клеток и различных биомолекул [4]. Разработка и внедрение в клиническую практику БЭК — актуальное направление регенеративной медицины. Одним из примеров БЭК является «Эквивалент дермальный ЭД», разработанный в Институте цитологии РАН, представляющий собой гидрогель на основе коллагена I типа, в который включены дермальные фибробласты (ДФ). Данное РП успешно применяется в клинической практике, эффективно помогает в заживлении ран [5]. Вместе

с тем оно обладает рядом недостатков, среди которых — невозможность обработки раны антисептическими препаратами во время применения данного РП и адгезия его к перевязочным материалам. Одним из способов компенсации этих свойств является создание вторичного коллагенового гидрогелевого РП, несущего антисептические препараты. Целью данной работы было исследование влияния 0,01% мирамистина, 0,05% хлоргексидина, 5% повидон-йода и 0,02% фурацилина на БЭК «Эквивалент Дермальный ЭД» и разработка биосовместимого с ним бесклеточного коллагенового гидрогелевого РП, содержащего антисептик. Влияние препаратов на жизнеспособность ДФ внутри БЭК оценивали по их метаболической активности и морфологии с использованием МТТ-теста и метода световой микроскопии в процессе прижизненного наблюдения. Было установлено, что 15-минутная инсталляция мирамистина, хлоргексидина и повидон-йода на БЭК негативно влияет на жизнеспособность ДФ в нем, поэтому применение этих препаратов совместно с БЭК «Эквивалент Дермальный ЭД» не рекомендовано. Фурацилин не оказал негативного влияния на ДФ. На следующем этапе исследования были разработаны бесклеточные коллагеновые гидрогели (КГ), содержащие антисептики. Для их формирования раствор коллагена смешивали с HEPES буфером в отношении 9:1. Затем добавляли один из антисептиков в объеме 0, 10, 25, 50 или 100% от объема смеси, тщательно перемешивали и инкубировали при температуре 30 °С. Влияние КГ, содержащих антисептики, на жизнеспособность ДФ оценивали методом модельных сред и при прямом контакте КГ с БЭК с использованием МТТ-теста. Было выявлено, что все варианты КГ, содержащих хлоргексидин обладают низкой биосовместимостью. Добавление в КГ повидон-йода в концентрациях $\leq 10\%$ не оказывает негативного влияния на жизнеспособность ДФ, что, вероятно, обусловлено испарением антисептика в процессе формирования КГ, а КГ, содержащие большее количество повидон-йода демонстрируют низкую биосовместимость. КГ, содержащие мирамистин в объеме $< 10\%$ от объема КГ могут быть биосовместимыми, однако скорее всего не будут иметь антисептического эффекта. КГ, содержащие фурацилин продемонстрировали высокую биосовместимость. На основе полученных данных были разработаны бесклеточные коллагеновые гидрогелевые РП, содержащие антисептики, которые являются биосовместимым с БЭК «Эквивалент Дермальный ЭД». Антисептическая эффективность этих РП — тема последующих исследований.

Список литературы

1. Каштанов А.Д., Васильев Ю.Л., Байрашевская А.В. Обзор современных материалов, применяемых для покрытия раневых поверхностей // Оперативная хирургия и клиническая анатомия (Пироговский научный журнал). 2020. Т. 4, № 2. С. 49–56. EDN: UVABJX doi: 10.17116/operhirurg2020402149
2. Ahmad N. *In vitro* and *in vivo* characterization methods for evaluation of modern wound dressings // *Pharmaceutics*. 2022. Vol. 15, N 1. ID 42. doi: 10.3390/pharmaceutics15010042
3. Weller C.D., Team V., Sussman G. First-line interactive wound dressing update: a comprehensive review of the evidence // *Front Pharmacol*. 2020, Vol. 11. ID 155. doi: 10.3389/fphar.2020.00155
4. Tavakoli S., Klar A.S. Advanced hydrogels as wound dressings // *Biomolecules*. 2020. Vol. 10, N 8. ID 1169. doi: 10.3390/biom10081169
5. Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Александер-Синклер Э.И. Эквивалент дермальный ЭД. Разработка и практика применения: Монография. Санкт-Петербург: Издательско-полиграфическая ассоциация высших учебных заведений, 2022. 270 с.

Ласков И.Г.✉, Маланин Д.А., Демещенко М.В., Бурка И.С., Володин И.В., Кондрашенко В.В.

Тендопротективное действие обогащенной тромбоцитами плазмы в условиях экспериментальной тендинопатии: регуляция матричных металлопротеиназ

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

✉ laskov.ilya@gmail.com

Аннотация. В статье исследуется влияние местного введения аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП) на экспрессию матричных металлопротеиназ при экспериментальной тендинопатии у крыс. Эксперимент показал, что ОТП снижает уровень экспрессии металлопротеиназ, сохраняя структуру сухожильной ткани и обладая тендопротективными свойствами.

Ключевые слова: тендинопатия; тромбоцитами обогащенная плазма; металлопротеиназы; экспериментальная модель; воспаление.

Laskov I.G., Malanin D.A., Demeshchenko M.V., Burka I.S., Volodin I.V., Kondrashenko V.V.

Tendoprotective effect of platelet-rich plasma in experimental tendinopathy: regulation of matrix metalloproteinases

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. The article studies the effect of local administration of autologous platelet-rich plasma (PRP) on the expression of matrix metalloproteinases in experimental tendinopathy in rats. The experiment showed that PRP reduces the level of expression of metalloproteinases, preserving the structure of tendon tissue and possessing tendoprotective properties.

Keywords: tendinopathy; platelet-rich plasma; metalloproteinases; experimental model; inflammation.

Тендинопатия, характеризующаяся дезорганизацией коллагеновых волокон и воспалительными изменениями, является сложным патологическим процессом, для лечения которого традиционно применяются нестероидные противовоспалительные препараты. Однако их эффективность ограничивается острой стадией заболевания, в то время как хронические изменения остаются неустранимыми. Одним из перспективных методов лечения является использование аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП), которая благодаря содержанию факторов роста оказывает выраженное противовоспалительное действие и способствует ремоделированию внеклеточного матрикса [1–5]. Целью настоящего исследования было оценить влияние локального введения ОТП на экспрессию матричных металлопротеиназ (ММП) в ткани пяточного сухожилия при экспериментальной модели тендинопатии. Эксперимент проведен на 20 половозрелых крысах линии Wistar, разделенных на пять групп. В экспериментальной группе моделирование тендинопатии осуществлялось путем введения 0,5 мл 10% суспензии стерильного талька, после чего проводились инъекции ОТП, гиалуроновой кислоты или их комбинации. Результаты оценивались через 10 недель. Иммуногистохимическое исследование показало значительное снижение уровня экспрессии ММП в цитоплазме теноцитов и клетках воспалительного инфильтрата в группах, где вводилась ОТП, как в монотерапии, так и в сочетании с гиалуроновой кислотой, по сравнению с контрольной группой. На основании полученных данных можно констатировать, что ОТП оказывает тендопротективное действие, способствуя сохранению структуры сухожильной ткани и снижению активности ММП, что делает её перспективной в лечении хронических тендинопатий. Таким образом, введение ОТП в область пораженного сухожилия приводит к значительному

уменьшению экспрессии металлопротеиназ, улучшает состояние сухожильной ткани и потенциально может замедлять прогрессирование тендинопатий.

Список литературы

1. Millar N.L., Murrell G.A.C., McInnes I.B. Inflammatory mechanisms in tendinopathy – towards translation // *Nat Rev Rheumatol.* 2017. Vol. 13, N 2, P. 110–122. doi: 10.1038/nrrheum.2016.213
2. Riley G., Curry V., DeGroot J., et al. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology // *Matrix Biol.* 2002. Vol. 21, N 2. P. 185–195. doi: 10.1016/S0945-053X(01)00196-2
3. Buono A.D., Oliva A., Osti L., et al. Metalloproteases and tendinopathy // *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013. Vol. 3, N 1. P. 51–57. doi: 10.11138/mltj/2013.3.1.051
4. Lipman K., Wang C., Ting K., et al. Tendinopathy: Injury, repair, and current exploration // *Drug Des Dev Ther.* 2018. Vol. 12. P. 591–603. doi: 10.2147/DDDT.S154660
5. Маланин Д.А., Рогова Л.Н., Григорьева Н.В., и др. Структурные изменения сухожилия при экспериментальной тендинопатии и введении аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы // *Наука и инновации в медицине.* 2021. Т. 6, № 3. С. 56–62. EDN: JKKNLV doi: 10.35693/2500-1388-2021-6-3-56-62

Лебедева А.И.✉, Мусина Л.А., Гареев Е.М., Шангина О.Р., Галаутдинов М.Ф., Терегулов И.И.

Применение фармакупунктуры диспергированным аллогенным биоматериалом для акто- и кардиопротекции после изнуряющей физической нагрузки в эксперименте

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Уфа, Россия

✉ jeol02@mail.ru

Аннотация. Фармакупунктурный метод с применением аллогенного биоматериала, изготовленного на основе экстрацеллюлярного бесклеточного матрикса у экспериментальных животных, испытывающих изнуряющую физическую нагрузку, способствует акто- и кардиопротекции, повышению выносливости.

Ключевые слова: аллогенный бесклеточный биоматериал; физическая нагрузка; акупунктура; актопротекция; кардиопротекция.

Lebedeva A.I., Musina L.A., Gareev E.M., Shangina O.R., Galautdinov M.F., Teregulov I.I.

Use of pharmacupuncture with powder-like allogeneic biomaterial for acto- and cardioprotection after exhausting physical activity in the experiment

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Ufa, Russia

Abstract. Pharmacupuncture method using allogeneic biomaterial made on the basis of extracellular acellular matrix in experimental animals experiencing exhausting physical activity promotes acto- and cardioprotection, increases endurance.

Keywords: allogeneic acellular biomaterial; physical activity; acupuncture; actoprotection; cardioprotection.

Повышение выносливости организма, испытывающего усиленную длительную физическую нагрузку, работающего на пределе возможностей ставит задачу разработки новых методов повышения работоспособности, недопинговых фармакологических средств коррекции и профилактики осложнений мышечной и кардиореспираторной систем. При изнуряющей физической нагрузке происходит пересокращение саркомеров мышечных волокон, разрыв сарколеммы, некроз с последующим фиброзированием. Энергодефицитные состояния организма являются первопричиной манифестации патоморфологических изменений миокарда. Аллогенный биоматериал (АБ), изготовленный на основе экстрацеллюлярного бесклеточного матрикса в различных модификациях широко применяется для стимуляции местной регенерации в поврежденных тканях и органах. Целью данного исследования явилось определение фармакупунктурного эффекта АБ для коррекции патоморфологических изменений скелетной мускулатуры, миокарда и определение физиологических особенностей организма. Тест Порсолта — вынужденное плавание до отказа с грузом 10% от массы тела является распространенной моделью исследования выносливости животных для тестирования фармакологических препаратов и поиска мер профилактики патологических состояний.

Материалы и методы. Было использовано 40 крыс самцов линии Вистар, которые подвергались принудительному плаванию с грузом 10% от массы тела в течение 30 суток. В опытной группе ($n = 20$) вводили суспензию АБ акупунктурно по 0,2 мл в биологически активные точки (Да-чжуй, Синь-шу, Ге-шу, Хуань-тяо, Чан-цян, Ян-лин-цюань, Шэнь-май, Вай-гуань, Чжоу-ляо). В контрольных группах ($n = 20$) вводили физиологический раствор по аналогичной методике. Перед выведением из опыта животным проводили

электрокардиографию (ЭКГ), тестировали на толерантную нагрузку (плавание с грузом), определяли лейкоформулу. Для морфологических и морфометрических исследований забор тканей сердца и мышц задних конечностей проводили спустя 5 и 21 суток.

Результаты. На 5-й и 21-й день в опытной группе уровень кратности толерантной нагрузки оказался выше, чем в контрольной ($Z = 2,12, p < 0,04$). Показатели крови в контрольных группах указывают на наличие умеренного лейкоцитоза ($8,842 \times 10^9/\text{л} \pm 2,3$) и лимфоцитоза ($77,2 \pm 3,8\%$). В опытной группе количество лейкоцитов составляло $7,7 \times 10^9/\text{л} \pm 1,8$, лимфоцитов $75 \pm 3,74\%$. ЭКГ крыс в контрольной группе — ЧСС 265 уд/мин, зубец Р отрицательный, зубец U отсутствовал, большой вольтаж зубца S; что связано с нарушением метаболизма миокарда и его проводящей системы. После применения АБ ЭКГ показала правильный синусовый ритм с ЧСС 360 ± 25 уд/мин, отсутствовали нарушения проводимости и изменения в комплексе QRS–T.

При морфологическом исследовании скелетной мышечной ткани конечностей в контрольной группе обнаруживались контрактуры III, IV степеней, признаки нарушения микроциркуляции — стаз, кровенаполнение, микроразрывы. Наблюдались признаки некробиотических процессов мышечных волокон — потеря поперечной исчерченности, дезорганизация Z-, M-линий, разрыв волокон, которые разрешались фиброзом. После введения АБ определялись признаки рабдомиогенеза, гиперплазии мышечных волокон, снижение численности некротизированных мышечных волокон. К 21 суткам структура мышечной ткани была приближена к интактной. Просвет сосудов свободный. Явления фиброза отсутствовали.

В контрольной группе через 5 суток в субэпикардальной зоне и в среднем слое миокарда выявлялись скопления литически измененных кардиомиоцитов (ЛИ КМЦ). Определялась периваскулярная лимфоидная инфильтрация сердечной ткани, полнокровие и стаз эритроцитов, лимфостаз. В интерстиции отмечалась лимфо-макрофагальная инфильтрация, отек. В кардиомиоцитах прослеживались контрактурные изменения II–III степени, разволокнения миофибрилл, гиперрелаксация саркомеров. Отмечалась локальная волнообразная деформация, что может способствовать нарушению ритма. Через 21 сутки в миокарде наблюдались признаки периваскулярного и интерстициального фиброза. После введения АБ спустя 5 суток в миокарде отмечались признаки регенеративного напряжения в виде гипертрофии кардиомиоцитов, лимфо-макрофагальная интерстициальная инфильтрация. Ряд кардиомиоцитов сохранял нормальную или незначительно измененную структуру. Реакция со стороны кровеносного русла была спокойной. Через 21 сутки морфогистологическая структура миокарда была приближена к норме. Численность ЛИ КМЦ оказалась значимо выше в контрольной группе, чем в опытной через 5 ($Z = 4,98, p \leq 0,0001$) и 21 сутки ($Z = 4,68, p \leq 0,0001$).

Выводы. Совокупность выявленных структурных повреждений отражала развитие регенераторно-пластической недостаточности, вызванной изнуряющей физической нагрузкой. Выявлены признаки интерстициального миозита, миокардита и ишемии. Фармакупунктура с АБ способствовала актопротекции, кардиопротекции, устойчивости к физической нагрузке. Отмечалось нивелирование некробиотических процессов, улучшение микроциркуляции, предупреждение фиброза.

Лебедев В.Н.✉, Дейнеко Д.В.

Синтез и исследование антибактериальных фосфатов кальция, содержащих катионы стронция, самария и цинка, для костной инженерии

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ vladimir.lebedev@chemistry.msu.ru

Аннотация. Трикальцийфосфат положительно зарекомендовал себя за счет хорошей биосовместимости. Однако инфекции, вызываемые патогенными бактериями, остаются трудноразрешимой проблемой. Поэтому стоит актуальный вопрос по созданию биосовместимых имплантатов с антибактериальным эффектом для костной ткани.

Ключевые слова: трикальцийфосфат; антибактериальный; биосовместимость; самарий; стронций; цинк.

Lebedev V.N., Deyneko D.V.

Synthesis and study of antibacterial calcium phosphates containing strontium, samarium and zinc cations for bone engineering

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Tricalcium phosphate has proven itself to be good due to its good biocompatibility. However, infections caused by pathogenic bacteria remain a difficult problem to solve. Therefore, there is an urgent issue of creating biocompatible implants with an antibacterial effect for bone tissue.

Keywords: tricalcium phosphate; antibacterial; biocompatibility; samarium; strontium; zinc.

Керамические имплантаты на основе низкотемпературной модификации фосфата кальция $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ используются в регенеративной медицине для восстановления поврежденной костной ткани благодаря её химическому подобию минеральной составляющей настоящей кости человека [1]. Риск бактериальной инфекции в послеоперационном периоде требует применения антибиотиков, что остается сложной проблемой из-за резистентности бактерий и образования биопленок на поверхности имплантата. Следовательно, существует необходимость в разработке новых материалов, которые не только обладают биосовместимыми свойствами, но и проявляют ингибирование роста распространенных штаммов микроорганизмов. Материалы химического состава $\text{Ca}_{8-x}\text{Sr}_x\text{SmZn}(\text{PO}_4)_7$ ($x = 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 8$) получены твердофазной химической реакцией. Определено, что дифференцировочный потенциал мезенхимальных стромальных клеток (МСК) остеогенной линии сохраняется в присутствии всех образцов $\text{Ca}_{8-x}\text{Sr}_x\text{ZnSm}(\text{PO}_4)_7$ без существенных различий в зависимости от концентрации катионов стронция. Получены положительные результаты по ингибированию роста микроорганизмов: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis* и *C. albicans* в присутствии материала $\text{Ca}_{8-x}\text{Sr}_x\text{SmZn}(\text{PO}_4)_7$. Таким образом, цитосовместимые и антибактериальные свойства полученных образцов химического состава $\text{Ca}_{8-x}\text{Sr}_x\text{ZnSm}(\text{PO}_4)_7$ делают данные фосфаты перспективными для создания антиинфекционных костных имплантатов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект № 23-73-10007).

Список литературы

1. Walsh W.R., Vizesi F., Michael D., et al. β -TCP bone graft substitutes 570 in a bilateral rabbit tibial defect model. // *Biomaterials*. 2008. Vol. 29, N 3. P. 266–271. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.09.035

Левичева Е.А. ✉, Егорихина М.Н., Боков А.Е., Чарыкова И.Н., Рубцова Ю.П., Линькова Д.Д.,
Фарафонтова Е.А., Алейник Д.Я.

Биологические характеристики материалов на основе полиуретана

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский медицинский исследовательский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, Россия

✉ kate.lekat@yandex.ru

Аннотация. Проведено исследование взаимодействия четырех полимеров семейства полиуретанов с добавлением различных рентгено-контрастных наполнителей с клетками человека на модели *in vitro*. Показано, что введение рентгено-контрастных веществ оказывает влияние на различные биологические характеристики композиций.

Ключевые слова: полиуретановый полимер; костно-замещающие материалы; пентаоксид тантала; оксид циркония; оксид висмута; цитотоксичность; фибробласты; цитосовместимость; адгезия.

Levicheva E.A., Egorikhina M.N., Bokov A.E., Charykova I.N., Rubtsova Yu.P., Linkova, D.D.,
Farafontova E.A., Aleynik D.Ya.

Biological characteristics of polyurethane-based bone-replacement materials

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. A study of the interaction of four polymers in the composition of polyurethanes with the addition of various radiopaque fillers with human cells on *in vitro* models was conducted. It was shown that the introduction of radiopaque substances affects various biological characteristics of the compositions.

Keywords: polyurethane polymer; bone-plastic materials; tantalum pentoxide; zirconium oxide; bismuth oxide; cytotoxicity; fibroblasts; cytocompatibility; adhesion.

Высокая потребность в костно-замещающих материалах в современной травматологии, ортопедии, онкологии и челюстно-лицевой хирургии в последнее десятилетие диктует необходимость в разработке и тестировании новых остеопластических материалов. Перспективными материалами для замещения костной ткани являются полимеры на основе полиуретана, характеризующиеся высокой биосовместимостью, биостабильностью и особенностями механических характеристик, приближенных к костной ткани [1]. Необходимость наблюдения за поведением полимерных материалов в организме потребовала создания полиуретанов со свойствами рентгеноконтрастности. Однако, не опубликовано данных о влиянии введения рентгеноконтрастных веществ на биологические характеристики полимеров на основе полиуретана.

Цель исследования: оценить взаимодействие оригинального материала на основе полиуретана и его модификаций, отличающихся рентгеноконтрастностью, с клетками человека на модели *in vitro*.

Было проведено исследование четырех материалов: оригинального полиуретана — полимера на основе полиоксипропиленгликоля, 4,4'-диизоцианатодифенилметана и глицерина (базовая композиция — состав 1) и его модификаций с добавлением рентгеноконтрастных наполнителей: 15% оксида висмута (состав 2), 15% пентаоксида тантала (состав 3), 15% оксида циркония (состав 4).

Для анализа биологических характеристик материалов оценивали уровень цитотоксичности и взаимодействие клеток человека с материалами в процессе культивирования на образцах. Оценку цитотоксичности проводили с помощью МТТ-теста и ранговой шкалы оценки цитотоксичности. При изучении цитосовместимости

материалов оценивались выраженность адгезии, изменение жизнеспособности и морфологии клеток, а также возможность пролиферации клеток на поверхности образцов. Для анализа использовалась флуоресцентная микроскопия с прижизненным окрашиванием клеток флюорохромами Hoechst 3334 (BD Pharmingen) и Calcein AM (BD Pharmingen). В качестве тестовой культуры были использованы охарактеризованные культуры фибробластов дермы человека, полученные в лаборатории биотехнологий ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России.

В работе было выявлено различное влияние исследованных составов на клетки тестовых культур. Экстракты образцов базового материала (состав 1) и материала, содержащего оксид циркония (состав 4), были не цитотоксичны при обоих сроках исследования (ранг цитотоксичности 0–1). Состав 2 по данным МТТ-теста характеризовался легкой токсичностью на обоих сроках экстракции (ранг 2). А у экстракта состава 3 было продемонстрировано отсутствие и легкая степень токсичности суточного экстракта (1–2 ранг) и средняя степень токсичности 7 суточного экстракта (ранг 3), которая при разведении экстракта полностью исчезала.

При культивировании клеток непосредственно на образцах состава 1 наблюдали равномерное распределение клеток по поверхности. Количество ядер клеток в процессе наблюдения на образцах этого состава увеличивалось. При этом лишь около 50% клеток имели типичную веретеновидную форму, свидетельствующую об их хорошей адгезии к поверхности образца. На образцах состава 2 клетки были распределены неравномерно в виде небольших островков. При этом на протяжении 72 часов клетки сохраняли жизнеспособность, но были шарообразной формы с укороченными отростками и практически не распластывались. На образцах с добавлением пятиокси тантала (состав 3) наблюдали неравномерное распределение клеток по поверхности. К 72 часам наблюдения по сравнению с 24 часами общее количество клеток и клеток с характерной морфологией возрастало. При культивировании клеток на поверхности образца с добавлением оксида циркония (состав 4) в течение 72 часов большинство клеток не распластывались, были шарообразной формы, а общее количество клеток на поверхности практически не изменялось.

Таким образом, при изучении взаимодействия клеток человека с полиуретановыми полимерами с различными рентгеноконтрастными наполнителями показано, что введение 15% соединений висмута, тантала или циркония по-разному влияет на биологические характеристики составов. В зависимости от модификации изменялся уровень токсичности, пролиферативная активность или выраженность клеточной адгезии. В тоже время все выявленные в процессе исследования изменения биологических характеристик были не критичны, что позволило считать изученные композиции цитосовместимыми и рассматривать их как перспективные для дальнейших исследований в качестве основы костно-замещающих материалов.

Список литературы

1. Filip N., Radu I., Veliceasa B., et al. Biomaterials in orthopedic devices: Current issues and future perspectives // *Coatings*. 2022. Voll. 12, N 10. ID 1544. doi: 10.3390/coatings12101544

Лимаев И.С.¹ ✉, Емелин А.М.¹, Корокин М.В.², Яковлев И.А.³, Покровский В.М.², Кузубова Е.В.², Деев Р.В.^{1,3}

Влияние AAV-опосредованной доставки гена *DYSF* на проявления регенерации скелетных мышц мышей с дисферлинопатией

¹ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Россия

³ ОАО «Генотаргет», Москва, Россия

✉ is.limaev@proton.me

Аннотация. Изучали влияние двухвекторной системы доставки гена *DYSF* (AAV9.DYSF) на проявления регенерации скелетных мышц мышей линии Bla/J. Установлено, что введение AAV9.DYSF уменьшает признаки повреждения и воспаления, способствуя проявлениям регенерации скелетных мышц.

Ключевые слова: дисферлинопатия; *DYSF*; поперечнополосатая скелетная мышечная ткань; регенерация мышц; ПКМД R2; генная терапия; иммунный ответ.

Limaev I.S.¹, Emelin A.M.¹, Korokin M.V.², Yakovlev I.A.³, Pokrovskiy V.M.², Kuzubova E.V.², Deev R.V.^{1,3}

The effect of AAV-mediated *DYSF* gene delivery on the morphofunctional characteristics of skeletal muscles in mice with dysferlinopathy

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Ministry of Science and Higher Education of Russia, Moscow, Russia

² Belgorod State National Research University, Belgorod, Russia

³ Genotarget LLC, Moscow, Russia

Abstract. The study investigated the effect of a dual-vector *DYSF* gene delivery system (AAV9.DYSF) on skeletal muscle regeneration in Bla/J mice. The results demonstrate that AAV9.DYSF administration reduces signs of damage and inflammation, promoting skeletal muscle regeneration.

Keywords: dysferlinopathy; *DYSF*; skeletal muscle tissue; muscle regeneration; LGMD R2; gene therapy; immune response.

Дисферлинопатия — редкая (1–9:1 000 000, Orphanet, 2024) наследственная мышечная дистрофия, характеризующаяся мутациями в гене *DYSF*, кодирующем белок дисферлин [1]. Мутации в гене *DYSF* обуславливают несостоятельность репаративных механизмов, инициируя атрофию, некроз, фиброзное и жировое замещение мышечных волокон (МВ), а также развитие местного воспалительного процесса [2]. Дисферлинопатия характеризуется прогрессирующей мышечной слабостью, что приводит к ограничению подвижности вследствие первичного поражения скелетной мускулатуры и формирования контрактур на поздних стадиях. Поиск терапевтических подходов для лечения дисферлинопатии неразрывно связан с исследованием механизмов регенерации поперечнополосатой скелетной мышечной ткани. Положительная динамика репаративных процессов в скелетных мышцах проявляется в уменьшении доли некротизированных МВ, увеличении доли центральоядерных МВ, увеличении пролиферативной активности миосателлитоцитов и ядер МВ и снижении выраженности проявлений местного воспалительного процесса [3]. Комплексная оценка тканевого влияния генотерапевтических конструкций, способствующих активации регенераторных процессов, является ключевым направлением в разработке эффективных методов терапии этого заболевания.

Цель исследования — изучить влияние AAV-опосредованного генного трансфера на проявления регенерации скелетных мышц мышей линии Bla/J.

Исследование выполнено на трансгенных мышцах B6.A-Dysf^{prmd}/GeneJ Bla/J, содержащих ретротранспозон в 4 интроне гена *DYSF*, нарушающий процесс сплайсинга и синтез дисферлина (The Jackson Laboratory, США). Использовали самцов линии Bla/J в возрасте 6 месяцев ($n = 42$). Животным внутримышечно вводили AAV9.DYSF (двухвекторная система доставки полноразмерного гена *DYSF*). Мышей выводили из эксперимента через 3 ($n = 21$) и 6 ($n = 21$) месяцев передозировкой эфирного наркоза, проводили забор образцов скелетной мышечной ткани. Отрицательным контролем служили мыши линии Bla/J, которым внутримышечно вводили 150 мкл физиологического раствора ($n = 15$). Положительным контролем служили интактные мыши линии C57Bl/6 ($n = 15$). Для патогистологического исследования забирали *m. gastrocnemius*, *m. psoas major*, *m. vastus lateralis* и *m. gluteus superficialis*. Часть мышц фиксировали в 10% забуференном формалине, заливали в парафин по стандартной методике, готовили срезы толщиной 4 мкм. Другую часть мышц фиксировали в охлажденном в жидком азоте изопентане, готовили криосрезы толщиной 6 мкм. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином: определяли долю некротизированных МВ, долю центральоядерных МВ и среднюю площадь поперечного сечения МВ. Пролиферативную активность определяли на срезах, окрашенных иммуногистохимически с антителами к Ki-67. Для оценки воспалительного ответа проводили иммуногистохимическое исследование с антителами к CD3, CD68 и CD163 (Abcam, Великобритания). Анализ наличия и паттерна распределения дисферлина проводился с использованием иммунофлуоресцентного исследования с антителами к дисферлину (ab24684, 1:200; Abcam). Микропрепараты сканировали на цифровом сканере Aperio CS2 (Leica Microsystems, Германия). Изображения анализировали с использованием программы Aperio ImageScope (Leica Biosystems, Германия). Статистическую достоверность различий оценивали в программе Statistica 13.3 критерием Краскела–Уоллиса для нескольких независимых выборок то значением $p < 0,05$ в качестве уровня значимости.

Иммунофлуоресцентный анализ показал наличие дисферлина в сарколемме и саркоплазме трансдуцированных МВ мышцей линии Bla/J. Морфометрический анализ препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, продемонстрировал статистически значимое уменьшение доли некротизированных МВ в группе, получавшей генную терапию, по сравнению с контрольной группой во всех мышцах на всех исследованных сроках. В группе с генной терапией отмечено увеличение количества МВ с центрально расположенными ядрами, однако различия не имели статистической значимости. Средняя площадь поперечного сечения МВ была статистически достоверно больше в группе с генной терапией на всех исследованных сроках, свидетельствуя об уменьшении выраженности атрофии вследствие дефицита дисферлина. Исследование с антителами к Ki-67 выявило статистически значимое повышение пролиферативной активности в группе с генной терапией по сравнению с отрицательным контролем, свидетельствуя об активации процесса регенерации при восстановлении синтеза дисферлина. Иммуногистохимический анализ выявил статистически достоверное снижение числа CD3⁺-лимфоцитов, CD68⁺- и CD163⁺-макрофагов на сроке 6 месяцев у мышцей линии Bla/J, получавших AAV9.DYSF, по сравнению с контрольной группой.

Результаты исследования показывают, что AAV-опосредованная доставка гена *DYSF* приводит к выработке белка дисферлина в МВ, уменьшая признаки повреждения и воспаления, а также активации регенераторных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2021-1346.

Список литературы

1. orpha.net [Электронный ресурс]. Orphanet: Dysferlin-related limb-girdle muscular dystrophy R2. 10.04.2024 [дата обращения: 27.05.2024]. Режим доступа: <https://www.orpha.net/en/disease/detail/268>
2. Klinge L., Harris J., Sewry C., et al. Dysferlin associates with the developing T-tubule system in rodent and human skeletal muscle // Muscle Nerve. 2010. Vol. 41, N 2. P. 166–173. doi: 10.1002/mus.21166
3. Яковлев И.А. и др. Вирусная доставка гена *DYSF* *in vivo* оказывает гистопротективный эффект в скелетной мышечной ткани у мышцей с дисферлинопатией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2022. Т. 174, № 12. С. 743–749.

Линькова Д.Д. ✉, Егорихина М.Н., Рубцова Ю.П., Чарыкова И.Н., Фарафонтובה Е.А., Левичева Е.А., Алейник Д.Я.

Особенности функциональной активности МСК в различных 3D-структурах при нормоксии и гипоксии

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

✉ linckovadaria@yandex.ru

Аннотация. На модели *in vitro* показано, что, изменяя условия культивирования (состав и структуру скаффолда-носителя, содержание кислорода в среде), можно модулировать паракринную активность МСК для повышения их выживаемости при трансплантации.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки (МСК); скаффолд-технологии; ниша стволовой клетки; гипоксия; секреторная активность.

Linkova D.D., Egorikhina M.N., Rubtsova Yu.P., Charykova I.N., Farafontova E.A., Levicheva E.A., Aleynik D.Ya.

Features of the functional activity of MSCs in various 3D-structures in normoxia and hypoxia

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Privolzhsky Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. An *in vitro* model has shown that by changing the cultivation conditions (composition and structure of the scaffold, oxygen content in the medium), it is possible to modulate the paracrine activity of MSCs to increase their survival during transplantation.

Keywords: mesenchymal stem cells (MSCs); scaffold-technologies; stem cell niche; hypoxia; secretory activity.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают высоким регенеративным потенциалом, прежде всего благодаря своей паракринной активности. Однако при трансплантации МСК попадают в условия ограничения доступа питательных веществ и кислорода, что значительно снижает их терапевтический потенциал. Оптимизация свойств МСК в организме после трансплантации может обеспечиваться:

1) использованием скаффолдов, обеспечивающих оптимальные условия для их выживания и поддержания функциональной активности [1];

2) предварительным культивированием в гипоксической среде с уровнем кислорода 2–9%, что позволяет поддерживать МСК в недифференцированном состоянии с сохранением функций и пластичности [2]. Изменение условий культивирования МСК и особенности скаффолда-носителя могут влиять на секреторную активность клеток. Цель исследования — изучить особенности секреторной активности МСК человека в 3D-структурах в условиях с различным уровнем кислорода.

Методы. Изучали секреторную активность МСК, выделенных из жировой ткани человека, по накоплению протеинов в кондиционной среде в процессе культивирования в различных 3D-структурах. Содержание протеинов в среде определяли методом твердофазного иммуоферментного анализа на 1, 3 и 7 сутки культивирования после формирования скаффолдов/посева клеток. На первом этапе работы сравнивали 3 серии: КК — культура МСК на пластике (контроль культуры в 2D условиях), СК — оригинальный фибрин-коллагеновый гидрогелевый скаффолд [3] — для оценки динамики выхода протеинов в процессе наблюдения, ТИК1 — конструктор, состоящий из СК в качестве носителя с инкапсулированными в него МСК. Образцы культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, абс. влажность). На втором этапе анализировали секреторную активность МСК на пластике (КК) и на различных носителях: на фибрин-коллагеновом гидрогелевом скаффолде (ТИК1), на коллагеновой гемостатической губке (ТИК2), на фибриновом

гидрогелевом скаффолде (ТИК3). Клетки на всех носителях культивировали при 37°C, абсолютной влажности, но на различном уровне кислорода: при нормоксии ~20% O₂ и при гипоксии ~5% O₂.

На первом этапе выявили различную динамику выделения и накопления протеинов в среде в разных сериях. Так, NGF, ИЛ-10, ИЛ-13, IGF, PDGF-BB во всех сериях отсутствовали или их содержание было минимальным. Значительное содержание FN, SDF-1α, PGE-2 в среде, окружающей бесклеточные скаффолды (СК), скорее всего, было обусловлено их высоким уровнем в криопреципитате, использовавшимся при их формировании. В средах с МСК на пластике и в ТИК1 наблюдали накопление факторов, стимулирующих ангиогенез и участвующих в процессах пролиферации и регенерации. При этом в среде клеток на пластике отмечали высокие концентрации VEGF-A, MCP-1, SDF-1α, в то время как в средах ТИК1 преобладали HGF, ИЛ-8 [4]. На втором этапе работы ряд протеинов (NGF, PDGF-BB, ИЛ-13), как и на первом, были на минимальном уровне во всех сериях на всех сроках исследования. В средах ТИК2 определили минимальные концентрации большинства факторов, но при гипоксии выявили повышение уровня VEGF-A, MCP-1, ИЛ-6 и PGE-2. Колебания уровней VEGF-A и MCP-1 продемонстрировали аналогичную динамику во всех сериях: концентрация в динамике постепенно возрастала с резким подъемом на 7 сутки. При этом уровень VEGF-A преобладал при гипоксии, и его содержание было сопоставимо во всех сериях, а концентрация MCP-1, напротив, была выше при нормоксии с наиболее высокими значениями в средах ТИК3. Уровень фибронектина (Fn) стабильно возрастал в средах КК и ТИК3, как при нормоксии, так и при гипоксии. Одновременно в средах ТИК1 отмечали противоположную динамику: концентрация Fn на 1 сутки наблюдения более чем в 10 раз превышала значения в контроле, затем снижалась, но была выше чем в серии КК. Накопление ИЛ-6 наблюдали в средах КК, ТИК1 и ТИК2, при гипоксии интенсивнее, чем при нормоксии. В средах ТИК3 фиксировали иные результаты. На всех сроках при нормоксии уровень ИЛ-6 в среде прогрессивно возрастал, а в условиях гипоксии содержание этого интерлейкина либо снижалось, либо оставалось на том же уровне. Во всех сериях фиксировали высокие значения PGE-2 (простагландина E2) на 1 сутки, максимальные в средах ТИК1. При последующем культивировании количество PGE-2 в средах уменьшалось вне зависимости от условий культивирования. Однако при гипоксии на 1 и 7 сутки наблюдения его уровень был выше, чем для тех же серий в условиях нормоксии. При этом в средах КК и ТИК2 значения PGE-2 были минимальными по сравнению с другими сериями.

Таким образом, изменяя условия культивирования (состав и структуру скаффолда-носителя, содержание кислорода в среде), можно модулировать паракринную активность МСК. Наш опыт и полученные результаты могут быть полезны специалистам, разрабатывающим тканеинженерные конструкции и методы оценки их качества на различных этапах исследований *in vitro*.

Список литературы

1. Egorikhina M.N., Rubtsova Y.P., Charykova I.N., et al. Biopolymer hydrogel scaffold as an artificial cell niche for mesenchymal stem cells // *Polymers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N 11. ID 2550. doi: 10.3390/polym12112550
2. Nowak-Stepniowska P.N., Osuchowska H., Fiedorowicz E.A. Trafny, insight in hypoxia-mimetic agents as potential tools for mesenchymal stem cell priming in regenerative medicine // *Stem Cells Int*. 2022. ID 8775591. doi: 10.1155/2022/8775591
3. Egorikhina M.N., Aleynik D.Y., Rubtsova Y.P., et al. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics // *Bioact Mater*. 2019. Vol. 4. P. 334–345. doi: 10.1016/j.bioactmat.2019.10.003
4. Aleynik D.Ya., Charykova I.N., Rubtsova Y.P., et al. Specific features of the functional activity of human adipose stromal cells in the structure of a partial skin-equivalent // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 12. ID 6290. doi: 10.3390/ijms25126290

Лисина О.Ю.✉, Шарипов Р.Р., Московцев А.А., Сурин А.М.

Ингибирование NMDA-каналов ускоряет репарацию нейрональной сети при механическом повреждении первичной нейрональной культуры из мозжечка крысы

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

✉ anezi@yandex.ru

Аннотация. Скорость и степень репарации нейрональной сети в зоне механического повреждения первичной нейрональной культуры из мозжечка крысы увеличивались при ингибировании NMDA-каналов (МК-801, 0,3 и 1,0 мкМ). Мониторинг процесса осуществляли методом цейтраферной микроскопии каждые 15 мин в течение 7 суток.

Ключевые слова: нейрональная сеть; NMDA-рецептор; нейрональная культура; МК-801; NMDA; нейрит.

Lisina O.Yu., Sharipov R.R., Moskovtsev A.A., Surin A.M.

Inhibition of NMDA-channels accelerates recovery of neural network in rat cerebellar primary culture subject to mechanical damage

Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

Abstract. The rate and extent of neuronal network reparation in the mechanical damage zone of the rat cerebellar primary culture increased with inhibition of NMDA channels (MK-801, 0.3 and 1.0 μM). The process was monitored by time-lapse microscopy every 15 min for 7 days.

Keywords: neuronal network; NMDA receptor; neuronal culture; MK-801; NMDA; neurite.

В работе исследовали регенерацию нейрональной сети в зоне механического повреждения первичной культуры гранулярных клеток мозжечка крысы. Ранее нами было показано, что в момент нанесения повреждения (царапины) происходит скачок внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), амплитуда которого максимальна в нейронах на границе царапины и убывает по мере удаления от границы царапины в неповрежденную область [1]. Рост $[\text{Ca}^{2+}]_i$ всегда сопровождался митохондриальной деполяризацией. В ~90% нейронов изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и митохондриального потенциала блокировались ингибитором ионотропных глутаматных каналов NMDA-типа.

Первичные нейрональные культуры приготавливали из мозжечка 7-дневных самцов крыс породы Вистар. Животное анестезировали, декапитировали и извлекали мозжечок. Суспензию клеток получали, обрабатывая ткань мозжечка трипсином (0,05%), диссоциировали пипетированием и отмывали от разрушенных клеток двукратным осаждением в центрифуге. Полученную суспензию клеток в ростовой среде Neurobasal A Medium (Gibco, США) с добавлением 2% Supplement B-27 и 2,0 мМ L-глутамин наносили на покровные стекла диаметром 13 мм, прикрепленные к лункам 35 мм пластиковых чашек Петри (SPL Life Sciences, Корея). Стекла предварительно покрывали полиэтиленгликолем (1 мг/мл, 30 мин), не связавшийся полиэтиленгликоль отмывали деионизированной водой. Нейроны были посажены в 6 чашек, плотность посадки составляла примерно $2,5 \times 10^5$ клеток/лунку. Царапина шириной ≈ 1 мм была нанесена на монослой клеток спустя 72 часа после посадки.

Процесс репарации нейрональной сети в зоне механического повреждения монослоя нейронов регистрировали в течение 162 часов после нанесения царапины с помощью системы визуализации на базе микроскопа Nikon Ti2 (Nikon Corporation, Япония), на предметном столике которого постоянно находился

мини- CO_2 -инкубатор STX (Tokai Hit, Япония), который обеспечивал в камере температуру 37°C , атмосферу 5% CO_2 /95% воздуха и влажность 100%. В зоне механического повреждения наблюдалось прорастание нейритов и миграция клеток из неповрежденных областей, в соответствии с описанным ранее в работе [2]. Подсчет средней суммы площадей отдельных нейритов, конусов роста, «плотной» нейрональной сети и дедбриса в зоне царапины основан на комплексном использовании программ Ilastik (алгоритм Pixel Classification) и ImageJ. Обнаружено, что перманентная активация ионотропных глутаматных рецепторов NMDA-типа (NMDA 30 и 100 мкМ) имеет тенденцию к торможению прорастания нейритов в зону механического повреждения ($p > 0,1$). Напротив, частичная блокада NMDA-каналов с помощью МК-801 (0,3 и 1,0 мкМ) способствовала прорастанию нейритов из неповрежденных областей в зону царапины, причем площадь нейритов в зоне царапины при концентрации МК-801 1,0 мкМ была в 2 раза больше. Таким образом, метод цейтраферной фазово-контрастной микроскопии позволил обнаружить, что умеренное, но длительное стимулирование NMDA-каналов не увеличивает регенерацию нейрональной сети, тогда как частичная блокада этих ионотропных глутаматных рецепторов способствует регенерации нейрональной сети в зоне механического повреждения первичной культуры.

Уход за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с требованиями Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП».

Работа выполнена в рамках Гос. задания № FGFU-2022-0012.

Список литературы

1. Красильникова И.А., Бакаева З.В., Пинелис В.Г., и др. Изменения концентрации внутриклеточного кальция и митохондриального потенциала в клетках первичной культуры коры головного мозга крысы при острой механической травме // Патогенез. 2018. Т. 16, № 3. С. 124–128. EDN: QBCIAV doi: 10.25557/2310-0435.2018.03.124-128
2. Лисина О.Ю., Московцев А.А., Кубатиев А.А., Сурин А.М. Динамика изменений морфологии нейрональной сети и развития митохондрий в механически поврежденной первичной культуре нейронов // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018. Т. 62, № 2. С. 11–23. EDN: XWBRFJ doi: 10.25557/0031-2991.2018.02.11-23

Литвяков Н.В. ✉, Чойнзонов Е.Л.

Дедифференцировка нестволовых опухолевых клеток в стволовые как ключевой механизм перехода микрометастазов в макрометастазы

НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия

✉ nvlitv72@yandex.ru

Аннотация. В докладе будут освещены современные представления и собственные исследования, посвященные проблеме метастазирования опухолей, в частности изучения механизмов и роли процесса дедифференцировки опухолевых клеток, представлены данные по разработке на этой основе первого противометастатического препарата.

Ключевые слова: дедифференцировка опухолевых клеток; микрометастазы; гены стволовости; WNT-сигналинг; амплификации и делеции.

Litviakov N.V., Choinzonov E.L.

Dedifferentiation non-stem-to-stem cancer cells as a key mechanism for the transition of micrometastases to macrometastases

Cancer Research Institute of Tomsk NRMС, Tomsk, Russia

Abstract. The report will highlight modern ideas and our own research on the problem of tumor metastasis, in particular the study of the mechanisms and role of the process of dedifferentiation of tumor cells, and will present data on the development of the first antimetastatic drug on this basis.

Keywords: dedifferentiation of tumor cells; micro metastases; stemness genes; WNT signaling; amplifications and deletions.

Развитие метастатической болезни является основной причиной смерти онкологических больных в различные сроки после удаления первичной опухоли [1]. При этом, практически у всех онкологических пациентов, не первично-диссеминированными формами, уже на момент постановки диагноза, в печени, легких, костях и других вторичных органах уже есть множественные микрометастазы. Теперь только вопрос времени (от 3 мес. до 20 лет), генетического и эпигенетического ландшафта опухолевых клеток и поведения клеток микроокружения метастатических ниш, перейдут ли микрометастазы в макрометастазы. Способность к завершеному (с образованием макрометастазов) метастазированию имеет далеко не каждая опухоль, но с увеличением стадии и/или лекарственного воздействия, частота опухолей с такой способностью увеличивается.

Два основных процесса происходят при преобразовании микрометастазов в макрометастазы. Прежде всего, опухолевые клетки микрометастазов находятся в дормантном состоянии, поскольку по-другому не могут выжить. Если, при этом, пациент подвергался системной терапии, то клетки микрометастазов находятся еще и в состоянии терапевтического шока. И для того, что образовать макрометастаз, опухолевые клетки микрометастазов должны выйти из этих состояний. Второе, дормантные опухолевые полностью дифференцированы и им надо дедифференцироваться до состояния стволовых опухолевых клеток, чтобы дать начало макрометастазу. Дедифференцировка — это «бутылочное горлышко» метастазирования.

Поддержание и выход из дормантного состояния зависит от состояния микроокружения и активности WNT-сигналинга опухолевых клеток. Выход из терапевтического шока обусловлен эктопической активацией

канонического WNT-сигналинга опухолевых клеток. Как было доказано в наших клинических [2] и экспериментальных исследованиях [3] за счет амплификаций активаторов и/или делеций негативных регуляторов генов WNT-сигналинга, выжившие после терапии опухолевые клетки выходят из шока не теряя способность к дедифференцировке. Без эктопической активации WNT-сигналинга опухолевые клетки, подвергшиеся воздействию химиопрепаратов неспособны выходить из шока, дедифференцироваться и погибают. В этой связи, в мире активно идут более 20 экспериментальных и клинических исследований I–II фаз по антителам и малым молекулам — ингибиторам WNT-сигналинга.

В НИИ онкологии Томского НИМЦ мы уже более 10 лет занимаемся клиническими и экспериментальными исследованиями механизмов метастазирования опухолей и механизмов дедифференцировки нестволовых опухолевых клеток до опухолевых стволовых клеток. Нами было доказано, что дедифференцировка, обусловлена эктопической активацией генов стволовости в опухолевых клетках, это ключевая способность, инициирующая образование опухолевых стволовых клеток в микрометастазах, которые дают начало макростазам. Мы определили, клинически и экспериментально доказали, что эктопическая активация генов стволовости, обусловлена амплификациями его локусов в опухолевых клетках. На модифицированных нами опухолевых клеточных линиях, включая и выключая гены стволовости мы управляли способностью к дедифференцировке. Мы наблюдали, что под действием HT опухоль могла приобретать такие амплификации, если их изначально не было и это было сопряжено со 100% метастазированием или они могли элиминироваться под действием HT и тогда опухоль не метастазировала, а если пациентов с наличием амплификаций не лечить HT то вероятность их метастазирования также приближалась к 100% [4]. Более того, разработанный нами препарат на основе микроРНК, ингибирующий экспрессию генов стволовости, показал на животных беспрецедентную противометастатическую активность [5].

По сути, способность к дедифференцировке и активный WNT-сигналинг, определяют способность опухоли к метастазированию. Наша модель маркеров активности WNT-сигналинга и активности генов стволовости в первичной опухоли показала универсальность, беспрецедентную прогностическую значимость и диагностическую точность 80–90% на шести разных локализациях (рак легкого, молочной железы, гортани, яичника, шейки матки, колоректальный рак). Это, помимо практической значимости как прогностического маркера, говорит и о том, что разработанный нами первый противометастатический препарат и последующие препараты, которые будут действовать по механизму ингибирования дедифференцировки, потенциально являются препаратами PAN-CANCER.

Список литературы

1. Sopik V., Sun P., Narod S.A. Impact of microinvasion on breast cancer mortality in women with ductal carcinoma in situ // *Breast Cancer Res Treat.* 2018. Vol. 167. P. 787–795. doi: 10.1007/s10549-017-4572-2
2. Литвяков Н.В., Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., и др. Ассоциация сочетания aberrаций числа копий генов WNT-сигналинга и амплификаций генов стволовости в опухоли молочной железы с метастазированием // *Сибирский онкологический журнал.* 2020. Т. 19, № 3. С. 78–88. EDN: IVBNGJ doi: 10.21294/1814-4861-2020-19-3-78-88
3. Tsydenova I.A., Dolgasheva D.S., Gaptulbarova K.A., et al. WNT-conditioned mechanism of exit from postchemotherapy shock of differentiated tumour cells // *Cancers.* 2023. Vol. 15, N 10. ID 2765. doi: 10.3390/cancers15102765
4. Litviakov N.V., Ibragimova M.K., Tsyganov M.M., et al. Amplifications of stemness gene loci — new markers for the determination of the need for neoadjuvant chemotherapy for patients with breast cancer. A prospective study // *J Pers Med.* 2021. Vol. 11, N 5. ID 397. doi: 10.3390/jpm11050397
5. Nevskaya K.V., Pershina A.G., Hmelevskaya E.S., et al. Prevention of metastasis by suppression of stemness genes using a combination of microRNAs // *J Med Chem.* 2024. Vol. 67, N 7. P. 5591–5602. doi: 10.1021/acs.jmedchem.3c02199

Лихоманова Р.Б.^{1,2} ✉, Юдинцева Н.М.^{1,2}, Оганесян Е.А.², Фофанов Г.К.², Нечаева А.С.²,
Зиганшин Р.Х.³, Шевцов М.А.^{1,2}

Применение низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 для подавления миграции и инвазии первичных клеток глиобластомы

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Центр персонализированной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ tagaeva97@yandex.ru

Аннотация. Первичные клетки глиобластомы являются релевантной моделью для изучения механизмов подвижности. Настоящее исследование показало перспективность применения низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 для подавления процессов миграции и инвазии.

Ключевые слова: mHsp70; мультиформная глиобластома; первичные клетки глиобластомы; миграция; инвазия.

Likhomanova R.B.^{1,2}, Yudintceva N.M.^{1,2}, Oganesyanyan E.A.², Fofanov G.K.², Nechaeva A.S.²,
Ziganshin R.Kh.³, Shevtsov M.A.^{1,2}

Application of small molecule Hsp70 inhibitors to suppress migration and invasion of primary glioblastoma cells

¹ Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Personalized Medicine Centre, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Primary glioblastoma cells are a relevant model for studying motility mechanisms. The present study demonstrated the potential of application small molecule Hsp70 inhibitors to suppress migration and invasion processes.

Keywords: mHsp70; glioblastoma multiforme; primary glioblastoma cells; migration; invasion.

Мультиформная глиобластома (МГБ) является одной из самых высокоагрессивных опухолей головного мозга, обладающей высоким миграционным/инвазивным потенциалом и способностью к рецидиву [1]. Гетерогенность опухоли, а также присутствие в ней субпопуляции стволовых клеток, обуславливают быструю прогрессию заболевания и требуют новых подходов к терапии МГБ. Известно, что мембранная форма белка теплового шока 70 (mHsp70) экспрессируется в клетках МГБ и участвует в процессах роста и развития опухоли [2, 3]. Для исследования клеток МГБ *in vitro* релевантной моделью являются первичные клетки, полученные от пациента, которые наиболее полно отражают характеристики исходной опухоли. Целью данного исследования послужило получение первичных клеток глиобластомы и изучение влияния низкомолекулярных ингибиторов Hsp70 на процессы миграции и инвазии. Первичные клетки были выделены из фрагмента опухоли, полученного в ходе операции по удалению МГБ, по протоколу, представленному в [4]. Диагноз (GB IDH-wt, Grade IV) был подтверждён с помощью гистологического и иммуногистохимического анализов. Клетки культивировали в суспензии в среде DMEM/F12 с добавлением B27 (без витамина A), EGF и FGF. Клетки самопроизвольно формировали сфероиды различного диаметра (от 0,1 до 2 мм). С помощью конфокальной микроскопии показали, что клетки положительны по маркерам GFAP, β 3-tubulin, SOX2 и Nestin. Проточная цитометрия выявила наличие поверхностного маркера стволовости CD133 (90%

популяции) и маркера mHsp70 (100% популяции). Протеомный анализ липидных рафтов клеток показал наличие большого количества белков, связанных с ремоделированием цитоскелета, адгезией и подвижностью (CDC42, RHOA, NCAM1, NCAM2, MMP14). В связи с этим было протестировано влияние двух соединений, PES и JG-98, являющихся низкомолекулярными ингибиторами Hsp70, на характеристики подвижности первичных клеток глиобластомы. В работе использовали нетоксичные концентрации ингибиторов (по данным МТТ-теста). С помощью метода Transwell показали, что ингибиторы влияют на инвазивные свойства, уменьшая количество инвазирующих клеток на 40% ($p \leq 0,001$). Прижизненный трекинг клеток и последующий анализ миграционной активности показал, что при действии ингибиторов PES и JG-98 средняя скорость движения клеток снижается на 27% и 41% соответственно ($p \leq 0,001$). Используя метод флуоресцентно-активированной сортировки, разделили первичные клетки глиобластомы на две субпопуляции — с высокой и низкой экспрессией mHsp70. Ингибиторы оказали значительный эффект на снижение скорости субпопуляции клеток с высокой экспрессией mHsp70, по сравнению с субпопуляцией с низкой экспрессией mHsp70. Таким образом, применение ингибиторов Hsp70 является перспективным для снижения миграционного и инвазивного потенциалов первичных клеток глиобластомы, обладающих характеристиками стволовых.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Список литературы

1. Seker-Polat F., Pinarbasi Degirmenci N., Solaroglu I., Bagci-Onder T. Tumor cell infiltration into the brain in glioblastoma: from mechanisms to clinical perspectives // *Cancers (Basel)*. 2022. Vol. 14, N 2. ID 443. doi: 10.3390/cancers14020443
2. Elmallah M.I.Y., Cordonnier M., Vautrot V., et al. Membrane-anchored heat-shock protein 70 (Hsp70) in cancer // *Cancer Lett*. 2020. Vol. 469. P. 134–141. doi: 10.1016/j.canlet.2019.10.037
3. Shevtsov M., Bobkov D., Yudintceva N., et al. Membrane-bound heat shock protein mHsp70 is required for migration and invasion of brain tumors // *Cancer Res Commun*. 2024. Vol. 4, N 8. P. 2025–2044. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-24-0094
4. Seidel S., Garvalov B.K., Acker T. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. В кн.: Walker J.M., editor. *Methods in molecular biology*. Vol. 1235. 2015. P. 263–275. doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3_19

Лупатов А.Ю.¹ ✉, Сарыглар Р.Ю.¹, Вахрушев И.В.¹, Бурунова В.В.¹, Вторушина В.В.², Полтавцева Р.А.², Кречетова Л.В.², Бурменская О.В.², Павлович С.В.², Ярыгин К.Н.¹, Сухих Г.Т.²

Иммуномодулирующие свойства мезенхимных стромальных клеток

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

² ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

✉ alupatov@mail.ru

Аннотация. Мезенхимные стромальные клетки (МСК) нормальных тканей, за исключением эндометрия, а также опухолевой стромы способны подавлять *in vitro* ключевые иммунологические процессы. Иммуносупрессорные свойства этих клеток могут быть связаны с высоким уровнем экспрессии и секреции провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки; опухолевая строма; иммуномодуляция; воспаление; цитокины; клеточная терапия.

Lupatov A.Yu.,¹ Saryglar R.Yu.,¹ Vakhrushev I.V.,¹ Burunova V.V.,¹ Vtorushina V.V.,² Poltavtseva R.A.,² Krechetova L.V.,² Burmenskaya O.V.,² Pavlovich S.V.,² Yarygin K.N.,¹ Sukhikh G.T.²

Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells

¹ Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia.

² Research Center of Obstetrics, Gynecology, and Perinatology, Moscow, Russia

Abstract. Mesenchymal stromal cells (MSCs) of normal tissues, except the endometrium, as well as tumor stroma, are capable of suppressing key immunological processes *in vitro*. The immunosuppressive properties of these cells are associated with high levels of expression and secretion of proinflammatory cytokines.

Keywords: mesenchymal stromal cells; tumor stroma; immunomodulation; inflammation; cytokines; cell therapy.

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) являются одной из наиболее перспективных клеточных популяций, которая может быть использована в качестве препарата для клеточной терапии. Эти клетки легко выделяются из различных тканей, поддерживаются и размножаются в культуре, устойчивы к опухолевой трансформации и не вызывают этических возражений. МСК обладают слабой иммуногенностью, что позволяет использовать не только аутологичные, но и аллогенные клетки для терапии. Помимо способности стимулировать регенерацию, МСК обладают выраженными иммуномодулирующими свойствами. Важной особенностью МСК является их способность подавлять не только ключевые механизмы первичного иммунного ответа, но и клетки иммунологической памяти, которые играют ведущую роль в уже сформированном аутоиммунном процессе. В то же время, можно предположить, что, будучи основным элементом опухолевой стромы, МСК оказывают супрессорное влияние на противоопухолевый иммунитет, способствуя «уходу» опухоли от иммунологического контроля.

В рамках данного исследования, с использованием моделей *in vitro*, оценивали иммуномодулирующие свойства МСК, изолированных из нормальных тканей человека (жир, костный мозг, различные участки плаценты, пупочный канатик, пульпа молочного зуба, эндометрий), а также мезенхимных клеток выделенных из стромы опухолей молочной железы, колоректального рака и эктопического эндометриоза. Все МСК, полученные из нормальных и опухолевых тканей, за исключением МСК нормального эндометрия, обладали ярко выраженной способностью подавлять дифференцировку дендритных клеток (ДК) из моноцитов периферической крови при их сокультивировании. При этом, клетки не оказывали заметного супрессорного влияния на процесс созревания ДК в ответ на бактериальный липополисахарид. МСК эндометрия,

в отличие от других МСК, также не оказывали негативного влияния на пролиферацию Т-лимфоцитов в ответ на антигенный стимул и на NK-клеточную цитотоксичность в отношении опухолевой линии K562. Таким образом, отсутствие иммуносупрессорной активности отличало МСК нормального эндометрия от других типов МСК, включая МСК изолированные из эктопического эндометриоза. Среди исследованных клеток наиболее сильные иммуносупрессорные свойства проявляли МСК пуповины и жировой ткани. Нейральные стволовые клетки (НСК), выращиваемые в составе нейросфер на бессывороточных средах, подобно МСК из эндометрия, не проявляли иммуносупрессорных свойств *in vitro*. Однако при использовании для получения и поддержания НСК адгезивных культур и сред, содержащих сыворотку, эти клетки приобретали сходную с МСК морфологию и выраженную способность к негативной иммунорегуляции.

Сравнение профилей экспрессии мРНК в МСК пуповины и эндометрия методом полногеномного транскриптомного анализа, с последующей верификацией полученных результатов при помощи ПЦР в режиме реального времени, выявило многократное увеличение экспрессии провоспалительных генов в МСК пуповины. Повышенная экспрессия была ассоциирована с сигнальными путями IL-1, Онкостатин М, IL-6 и другими, которые могут участвовать в иммунологических реакциях, связанных с воспалением. Результаты мультиплексного анализа секретируемых МСК пуповины и МСК эктопического эндометриоза цитокинов показали, что эти клетки имеют повышенную секрецию цитокинов, ассоциированных с воспалением по сравнению с МСК нормального эндометрия, что подтверждает данные транскриптомных исследований. Среди растворимых факторов, секреция которых была повышена в 10–100 раз, такие цитокины как IL-1 β , IL-6, а также целый ряд хемокинов, ассоциированных с воспалением. Полученные результаты позволяют сделать предположение о важной роли факторов воспаления в иммуносупрессии, инициированной МСК.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5)

Лусс А.Л.¹ ✉, Боброва М.М.¹, Куликов П.П.¹, Фадеева И.С.², Сенотов А.С.², Минайчева В.В.²,
Тетерина А.Ю.³, Кобякова М.И.², Кескинов А.А.¹

Гидрогели на основе коллагена для замещения мягких тканей

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, Пущино, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова», Москва, Россия

✉ aluss@cspfmba.ru

Аннотация. В данной работе представлен способ получения биodeградируемого скаффолда, проанализированы его основные физико-химические и биологические характеристики, определены показатели пористости, прочности и упругости, а также выявлена высокая степень биосовместимости для мышечных клеток *in vitro*.

Ключевые слова: коллаген; гидрогель; скаффолд; регенерация мышечной ткани.

Luss A.L.¹, Bobrova M.M.¹, Kulikov P.P.¹, Fadeeva I.S.², Senatova A.S.², Minaychev V.V.², Teterina A.Yu.³,
Kobyakova M.I.², Keskinov A.A.¹

Hydrogels based on collagen for soft tissue regeneration

¹ Federal State Budgetary Institution «Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks» of the Federal medical and biological agency, Moscow, Russia.

² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

³ Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. This work presents a method for obtaining a biodegradable scaffold, analyzed its main physicochemical and biological characteristics, defined indicators of porosity, strength and elasticity, and also reveals a high degree of biocompatibility for muscle cells *in vitro*.

Keywords: collagen; hydrogel; scaffold; muscle tissue regeneration.

Повреждение мышечной ткани может быть обусловлено не только травмами и хирургическими вмешательствами, но и такими генетическими заболеваниями, как мышечная дистрофия Дюшена [1]. Мышечная ткань имеет эндогенный механизм регенерации, но значительные повреждения ведут к функциональным ограничениям и инвалидизации.

В последние годы разрабатываются тканеинженерные конструкции (скаффолды) для замещения объемной потери мышечной ткани. Такие конструкции должны заполнять образовавшуюся пустоту неправильной геометрии, обеспечивая структурную поддержку и стимулирование направленного роста мышечной ткани *de novo* за счет микрорельефа, а также включения лекарственных препаратов для стимуляции процесса регенерации и ангиогенеза [2].

В данной работе представлен способ получения тканеинженерной конструкции из гидрогеля на основе коллагена и гиалуроновой кислоты. Полученный скаффолд имеет слоистую структуру с разной степенью сшивки слоев, что способствует улучшенным механическим свойствам. В каждый слой скаффолда включены препараты разной природы, которые должны выделяться в разное время, включая антибактериальные, противовоспалительные, гемостатические лекарственные средства и активаторы пролиферации миогенных клеток.

Были охарактеризованы физико-химические и биологические свойства разработанного пористого гидрогелевого скаффолда, с использованием методов компьютерной томографии и сканирующей электронной

микроскопии. Показано, что разработанные биоинженерные скаффолды обладают многослойной пористой губчатой структурой при этом в матриксе присутствуют поры различных размеров. Установлено, что сшивка образцов обеспечивает высокие значения стабильности формы при полном отсутствии влияния сшивающего агента на архитектуру и биосовместимость полученного скаффолда. Определены прочностные характеристики скаффолдов и показано, что стерилизация этиленоксидом не оказывает какого-либо существенного влияния на значения прочности и иные физико-химические характеристики скаффолдов. Установлено, что пористые биоинженерные скаффолды с содержанием и без содержания фармакологических препаратов в условиях *in vitro* не обладают цитотоксическим и цитостатическим действием, не препятствуют адгезии и распластыванию клеток на их поверхности, не изменяют метаболические свойства клеток. При этом стерилизация этиленоксидом не оказывает цитотоксического эффекта и не снижает биосовместимость материалов. Показано, что в условиях *in vitro* пористые биоинженерные скаффолды с содержанием фармакологических препаратов, в отличие от пористых биоинженерных скаффолдов без содержания фармакологических препаратов, частично ингибируют провоспалительную активацию миелоидных и лимфоидных клеток человека, что обусловлено направленным действием противовоспалительных препаратов, включенных в состав скаффолдов.

Таким образом, разработанный тканеинженерный скаффолд имеет большой потенциал в регенеративной медицине для замещения мягких тканей.

Список литературы

1. Crisafulli S., Sultana J., Fontana A., et al. Global epidemiology of Duchenne muscular dystrophy: an updated systematic review and meta-analysis // *Orphanet J Rare Dis.* 2020. Vol. 15. ID 141. doi: 10.1186/s13023-020-01430-8
2. Mazzone E., Iaquineta M.R., Lanzillotti C., et al. Bioactive materials for soft tissue repair // *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. Vol. 9. ID 613787. doi: 10.3389/fbioe.2021.613787

Лыков А.П.¹ ✉, Горячкин А.М.², Долгалев Е.К.³, Повещенко О.В.¹, Дровосеков М.Н.²

Сравнительный анализ терапевтического потенциала рекомбинантного ангиогенина человека и кондиционированных сред соматических клеток при ожоге кожи у мышей

¹ НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ Стоматологическая клиника «Дентал-Сервис», Новосибирск, Россия

✉ aplykov2@mail.ru

Аннотация. Лечение термических ожогов кожи требует внедрения новых технологий, в том числе и с использованием генноинженерных препаратов. Показан терапевтический потенциал рекомбинантного ангиогенина человека сопоставимого с эффектом кондиционированных сред соматических клеток человека.

Ключевые слова: ожог кожи; рекомбинантный ангиогенин человека; кондиционированные среды соматических клеток.

Lykov A.P.¹, Goryachkin A.M.², Dolgalev E.K.³, Poveshchenko O.V.¹, Drovosekov M.N.²

Comparative evaluation of conditioned somatic cell medium and recombinant human angiogenin's therapeutic potential for CD-1 mice's skin burns

¹ RICEL — Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

³ Clinic of Facial Surgery and Dentistry "Dental Service", Novosibirsk, Russia

Abstract. The development of novel therapeutic approaches, such as the application of genetically modified medications, is necessary to cure thermal skin burns. It has been demonstrated that the therapeutic potential of recombinant human angiogenin is similar to that of human somatic cell conditioned media.

Keywords: skin burn; conditioned somatic cell medium; human recombinant angiogenin.

Проблема лечения пострадавших с ожогами является одной из ведущих медико-социальных проблем. Неоваскуляризация, которая происходит на ранней стадии заживления ран, в том числе и при ожогах, представляет собой сложный процесс, который включает взаимодействие между различными ангиогенными факторами и многими типами ангиогенных клеток. Одной из таких молекул является ангиогенин, представляющий собой РНКазу 5, влияющий не только на эндотелиальные клетки сосудов, но и на клетки гладкой мускулатуры и фибробласты [1]. Известно, что кондиционированные среды стволовых соматических клеток способствуют ускорению заживления раневых дефектов [2–4]. Цель — провести сравнительное исследование эффективности ангиогенина, кондиционированных сред мезенхимные стволовых клеток человека (КС-МСК), клеток эндотелиальной линии EA.Hy926 (КС-EA.Hy926) и фибробластов кожи человека (КС-ФБК) при глубоком ожоге кожи у мышей-самок CD-1. КС-МСК, КС-EA.Hy926 и КС-ФБК получали при их культивировании в питательной среде DMEM и DMEM/F12 с добавлением 10% FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина. Термический ожог кожи в области спины у мышей индуцировали металлической пластиной ($D = 1,52$ см), нагретой до 200°C, которую удерживали в течение 10 секунд, на депилированном участке кожи. В контрольной группе мышам не вводили ни каких препаратов, опытных группах тестируемые вещества вводили в объеме 1 мл, внутрикожно: ангиогенин (10 мкг/мл, Ангиофарм)

1, 2 и 3 раза с интервалом 7 суток, а КС-МСК, КС-ЕА.Ну926 и КС-ФБК однократно сразу после индукции ожога. Оценивали динамику заживления раневого дефекта на 7-е, 14-е и 21-е сутки. Площадь ожога рассчитывали по формуле: $S = (\pi D)/4$. При визуализации ожога показано формирование округлого дефекта площадью 1,8 см², с истончением слоев кожи. На 7-е сутки не выявлено различий площади ожог в исследуемых группах. На 14-е сутки показано значимое уменьшение площади ожога в опытных группах в сравнении с контролем ($p < 0,05$), за исключением 2-х кратного введения ангиогенина. На 21-е сутки в опытных группах отмечено значимое уменьшение площади ожога в сравнении с контролем, особенно в группе КС-ЕА.Ну926 и КС-ФБК ($p < 0.05$). Полученные результаты эффективности ангиогенина при ожогах не противоречат литературным данным [5]. Таким образом, рекомбинантный ангиогенин человека сопоставим по терапевтическому потенциалу с кондиционированными средами соматических клеток человека, содержащих широкий спектр биологически активных молекул, вовлеченных в регенерацию органов и тканей.

Список литературы

1. Weng C., Dong H., Bai R., et al. Angiogenin promotes angiogenesis via the endonucleolytic decay of miR-141 in colorectal cancer // *Mol Ther Nucleic Acids*. 2022. Vol. 27. P. 1010–1022. doi: 10.1016/j.omtn.2022.01.017
2. Li J.-Y., Ren K.-K., Zhang W.-J., et al. Human amniotic mesenchymal stem cells and their paracrine factors promote wound healing by inhibiting heat stress-induced skin cell apoptosis and enhancing their proliferation through activating PI3K/AKT signaling pathway // *Stem Cell Res Ther*. 2019. Vol. 10, N 1. ID 247. doi: 10.1186/s13287-019-1366-y
3. Lu Y., Yang Y., Xiao L., et al. Autocrine and paracrine effects of vascular endothelial cells promote cutaneous wound healing // *Biomed Res Int*. 2021. ID 6695663. doi: 10.1155/2021/6695663
4. Shin J.-M., Lee Y.-Y., Kim K.M., et al. The potential role of fibroblast-derived multi-peptide factors in activation of growth factors and β -Catenin in hair follicle cells // *J Cosmet Dermatol*. 2022. Vol. 21, N 11. P. 6184–6190. doi: 10.1111/jocd.15188
5. Гуляев А.Е., Шульгау З.Т., Сергазы Ш.Д., и др. Ранозаживляющее и противовоспалительное действие рекомбинантного ангиогенина человека // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022. Т. 22, № 3. С. 293–307. EDN: OZITRY doi: 10.30895/2221-996X-2022-22-3-293-307.

Лыков А.П.¹ ✉, Геворгиз Р.Г.², Железнова С.Н.², Уваров И.П.³, Суровцева М.А.¹, Ким И.И.¹, Повещенко О.В.¹

Влияние экстрактов микроводорослей и цианобактерий на пролиферацию соматических клеток человека *in vitro*

¹ НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ИнБЮМ им. А.О. Ковалевского РАН, Севастополь, Россия

³ Кольцовская ветеринарная клиника, Кольцово, Новосибирская обл., Россия

✉ aplykov2@mail.ru

Аннотация. Микроводоросли и цианобактерии — ценнейший источник биологически активных молекул. Показано, что экстракты микроводорослей и цианобактерий поддерживают пролиферацию клеток, даже в бессывороточной среде.

Ключевые слова: микроводоросли и цианобактерии; соматические клетки человека; пролиферация.

Lykov A.P.¹, Gevorgiz R.G.², Zheleznova S.N.², Uvarov I.P.³, Surovtseva M.A.¹, Kim I.I.¹, Poveshchenko O.V.¹

The impact of cyanobacteria and microalgae extracts on human somatic cell proliferation *in vitro*

¹ RICEL — Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russia

² A.O. Kovalevsky Institute of Biology of the Southern Seas, RAS, Sevastopol, Russia

³ Koltsovskaya Veterinary Clinic, Koltsovo, Russia

Abstract. Cyanobacteria and microalgae are excellent sources of physiologically active compounds. Microalgae and cyanobacteria extracts have been demonstrated to promote cell growth even in the absence of serum.

Keywords: microalgae and cyanobacteria; human somatic cells; proliferation.

Микроводоросли и цианобактерии — это источник широкого спектра биологически активных молекул, которые находят свое применение в различных областях фармацевтики, косметологии, нутрицевтики и медицины. В последнее время микроводоросли и цианобактерии рассматриваются как источник лекарственных соединений и ценных пищевых ингредиентов для культивирования различных типов соматических клеток человека и животных [1–4]. Показано защитное действие экстракта *Chlorella vulgaris* на мезенхимные стволовые клетки человека при индукции окислительного стресса перекисью водорода [5]. Целью исследования стала оценка влияния экстрактов микроводорослей и цианобактерий различных таксонов и ареалов обитания на соматические клетки человека (мезенхимные стволовые клетки костного мозга, эндотелиальные клетки EA.Hy926 и фибробласты кожи человека). Культуры микроводорослей и цианобактерий различных таксонов получены из коллекции гидробионтов ИнБЮМ (г. Севастополь). Экстракцию биологически активных молекул получали в водной фазе или в 1% растворе ДМСО при 37°C в течение 24 часов, осаждали центрифугированием при 3000 оборотов в минуту в течение 10 минут и при 15 300 оборотах в минуту в течение 10 минут, фильтровали. Мезенхимные стволовые клетки костного мозга человека (МСК), клетки эндотелиальной линии EA.Hy926 и фибробласты кожи человека (ФБК) из коллекции культур клеток НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск) наращивали в питательной среде DMEM и DMEM/F12 с добавлением с добавлением 10% FCS, 2 mM L-глутамин, 5 mM HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина. Пролиферативный потенциал клеток оценивали в питательных средах с добавлением 1% экстрактов микроводорослей и цианобактерий в присутствии и при добавлении 10% FCS в МТТ тесте. Показано, что наличие ДМСО экстрактов микроводорослей и цианобактерий усиливают пролиферацию МСК человека за исключением экстрактов *N. shiloi*. При культивировании клеток EA.Hy926 в бес сывороточной среде с добавлением водных экстрактов (из сухой

биомассы) и лиофильных экстрактов микроводорослей и цианобактерий пролиферативный потенциал клеток был сопоставим с потенциалом клеток в присутствии 10% FCS. В большинстве случаев экстракты микроводорослей и цианобактерий (из сухой биомассы и лиофильных экстрактов) в бес сывороточной среде были выше, чем в контроле и при наличии 10% FCS. Таким образом, экстракты микроводорослей и цианобактерий могут быть использованы как альтернатива FCS при культивировании клеток. Более того, некоторые цианобактерий, в силу синтеза фикоцианиан, могут быть использованы как метки для флуоресцентного анализа.

Список литературы

1. Лыков А.П., Геворгиз Р.Г., Железнова С.Н., и др. Влияние назначения per os мышам Balb/c спиртового и масляного экстракта фукоксантина на биохимические параметры и уровень цитокинов в сыворотке крови // Сибирский научный медицинский журнал. 2024. Т. 44, № 2. С. 58–63. EDN: TOWXKR doi: 18699/SSMJ20240207
2. Lykov A., Salmim A., Gevorgiz R., et al. Study of the antimicrobial potential of the *Arthospira platensis*, *Planktotrix agarhii*, *Leptolyngbya* cf. *ectocarp*i, *Roholiella mixta* nov., *Tetraselmis viridis*, and *Nanofrustulum shiloi* against gram-positive, gram-negative bacteria, and mycobacteria // Marine Drugs. 2023. Vol. 21, N 9. ID 492. doi: 10.3390/md21090492
3. Ng J.Y., Chua M.L., Zhang C., et al. *Chlorella vulgaris* extract as a serum replacement that enhances mammalian cell growth and protein expression // Front Bioeng Biotechnol. 2020. Vol. 8. ID 564667. doi: 10.3389/fbioe.2020.564667
4. Saberian M., Shahidi Delshad E. The role of *Spirulina platensis* on the proliferation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells // Iran J Microbiol. 2023. Vol. 15, N 1. P. 111–120. doi: 10.18502/ijm.v15i1.11925
5. Savvidou M.G., Georgiopoulou I., Antoniou N., et al. Extracts from *Chlorella vulgaris* protect mesenchymal stromal cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide // Plants (Basel). 2023. Vol. 12, N 2. ID 361. doi: 10.3390/plants12020361

Лыков А.П.¹ ✉, Горячкин А.М.², Долгалев Е.К.³, Повещенко О.В.¹, Дровосек М.Н.²

Оценка влияния рекомбинантного ангиогенина человека на профиль цитокинов в сыворотке крови и экстрактах ткани ожоговой раны кожи у мышей CD-1

¹ НИИКЭЛ — филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО НГМУ Минздрава России, Новосибирск, Россия

³ Клиника хирургии лица «Дентал-Сервис», Новосибирск, Россия

✉ aplykov2@mail.ru

Аннотация. Биомедицинские клеточные продукты нашли свое применение в регенеративной медицине. Показана способность рекомбинантного ангиогенина человека, как и кондиционированных сред соматических клеток человека, влиять на спектр активных молекул в сыворотке крови и в ткани ожоговой раны.

Ключевые слова: ожог кожи; рекомбинантный ангиогенин человека; кондиционированные среды соматических клеток; цитокины.

Lykov A.P.¹, Goryachkin A.M.², Dolgalev E.K., Poveshchenko O.V.¹, Drovosekov M.N.²

Analyzing how recombinant human angiogenin affects the cytokine profile in skin burn wound tissue extracts and blood serum in CD-1 mice

¹ RICEL — Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

³ Clinic of Facial Surgery and Dentistry "Dental Service", Novosibirsk, Russia

Abstract. Regenerative medicine has discovered use for biomedical cell products. It has been demonstrated that human angiogenin recombinant and human somatic cell conditioned media can affect the range of active molecules in blood serum and burn wound tissue.

Keywords: skin burn; conditioned somatic cell medium; human recombinant angiogenin; cytokines.

Ангиогенин — член семейства РНКаз относится к проангиогенным факторам [1]. Ангиогенин способствует заживлению ран, в том числе и ожоговых ран. Ведутся исследования эффективности рекомбинантного ангиогенина человека при ранах кожи и слизистых оболочек полости рта [2, 3]. Цель исследования — оценка уровня цитокинов (IL-1 β , TNF α , IL-10), VEGF и NO в сыворотке крови и в экстракте тканей кожи в динамике заживления ожоговой раны у мышей CD-1. КС-МСК (кондиционированная среда мезенхимных стволовых клеток костного мозга человека), КС-ЕА.Ну926 (кондиционированная среда клеток эндотелиальной линии ЕА.Ну926) и КС-ФБК (кондиционированная среда фибробластов кожи человека) получали при их культивировании в питательной среде DMEM и DMEM/F12 с добавлением 10% FCS, 2 мМ L-глутамин, 5 мМ HEPES-буфера, 80 мкг/мл гентамицина. Термический ожог кожи в области спины у мышей индуцировали металлической пластиной ($D = 1,52$ см), нагретой до 200°C, которую удерживали в течение 10 секунд, на депилированном участке кожи. В контрольной группе мышам не вводили ни каких препаратов, опытных группах тестируемые вещества вводили в объеме 1 мл, внутрикожно: ангиогенин (10 мкг/мл, Ангиофарм) 1, 2 и 3 раза с интервалом 7 суток, а КС-МСК, КС-ЕА.Ну926 и КС-ФБК однократно сразу после индукции ожога. Биологические образцы (сыворотка крови, кожа) забирали на 7-е, 14-е и 21-е сутки эксперимента. Уровень цитокинов и ростового фактора определяли с использованием ИФА наборов, а уровень NO — используя реактив Грисса.

Влияние инъекций ангиогенина на уровень в сыворотке крови IL-1 β зависит от кратности введений. Ангиогенин способствует снижению уровня TNF α в сыворотке крови с учетом кратности введений и на разные сроки наблюдений. Уровень в сыворотке крови IL-10 возрастает при многократном введении ангиогенина в область ожога. Ангиогенин способствует приросту уровней VEGF в сыворотке крови и снижению NO. Ангиогенин увеличивает уровень IL-1 β , TNF α в тканях кожи. Ангиогенин снижает уровень IL-10 в тканях кожи. Влияние ангиогенина на уровень VEGF в тканях кожи зависит от кратности введений. Ангиогенин способствует приросту уровня NO в тканях кожи при ожоге.

Известно, что эндотелиальные клетки и фибробласты кожи продуцируют широкий спектр биологически активных молекул, а также тот факт, что на спектр продукции данных молекул влияет микроокружение [4, 5]. Таким образом, ангиогенин влияет на уровень продукции про- и противовоспалительных цитокинов, VEGF и NO как на системном (сыворотка крови), так и на локальном уровнях (ткань кожи из области ожоговой раны).

Список литературы

1. Bhatta A., Hillen H.S. Structural and mechanistic basis of RNA processing by protein-only ribonuclease P enzymes // *Trends Biochem Sci.* 2022. Vol. 47, N 11. P. 965–977. doi: 10.1016/j.tibs.2022.05.006
2. Гуляев А.Е., Шульгау З.Т., Сергазы Ш.Д., и др. Ранозаживляющее и противовоспалительное действие рекомбинантного ангиогенина человека // *Биопрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022. Т. 22, № 3. С. 293–307. EDN: OZITRY doi: 10.30895/2221-996X-2022-22-3-293-307
3. Горячкин А.М., Сысолятин П.Г., Черданцева Л.А., и др. Влияние геля на основе рекомбинантного человеческого ангиогенина на заживление донорских ран неба // *Стоматология.* 2019. Т. 98, № 1. С. 34–37. EDN: YYVQYH doi: 10.17116/stomat2019980134
4. Bork C.S., Baker E.J., Lundbye-Christensen S., et al. Lowering the linoleic acid to alpha-linoleic acid ratio decreases the production of inflammatory mediators by cultured human endothelial cells // *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2019. Vol. 141. P. 1–8. doi: 10.1016/j.plefa.2018.12.001
5. Pereira A.F.C., Igarashi M.H., Mercuri M., et al. Whitening effects of cosmetic formulation in the vascular component of skin pigmentation // *J Cosmet Dermatol.* 2020. Vol. 19, N 1. P. 154–160. doi: 10.1111/jocd.12979

Люблинская О.Г.

Генетически-кодируемые биосенсоры как инструмент для изучения редокс-метаболизма МСК

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ o.lyublinskaya@mail.ru

Аннотация. В настоящем исследовании мы демонстрируем возможности, которые открывает эктопическая экспрессия генетически-кодируемого биосенсора перекиси водорода HyPer, а также pH-чувствительного биосенсора SypHer, для изучения редокс-метаболизма мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека.

Ключевые слова: генетически-кодируемые биосенсоры; редокс-метаболизм; мезенхимные стволовые/стромальные клетки человека; МСК.

Lyublinskaya O.G.

Genetically encoded biosensors as a tool to investigate redox metabolism in human MSCs

Institute of Cytology, St.Petersburg, Russia

Abstract. In this study, we demonstrate the potential of ectopic expression of the genetically encoded hydrogen peroxide biosensor HyPer and the pH-sensitive biosensor SypHer to study redox metabolism in human mesenchymal stem/stromal cells.

Keywords: genetically encoded biosensors; redox metabolism; mesenchymal stem/stromal cells; MSCs.

Нарушение внутриклеточного метаболизма сопровождается развитием многих социально-значимых патологий человека. Так, нарушения редокс-метаболизма клеток могут маркировать, а во многих случаях и индуцировать, нейродегенеративные, сердечно-сосудистые, онкологические заболевания, а также процессы клеточного старения (сенесценции). До недавнего времени существовал очень ограниченный набор экспериментальных методов, позволяющих детектировать и изучать патологические изменения редокс-метаболизма в живых клетках. Однако, изобретение генетически-кодируемых биосенсоров позволило существенно расширить палитру инструментов для выявления подобных нарушений. В настоящем исследовании мы демонстрируем возможности, которые открывает эктопическая экспрессия биосенсора перекиси водорода HyPer [1], а также pH-чувствительного биосенсора SypHer [2], для изучения редокс-метаболизма мезенхимных стволовых/стромальных клеток человека (МСК).

1) Мы показали, что HyPer может быть использован как для качественных, так и для количественных оценок уровня внутриклеточной H₂O₂ в разных компартментах МСК при индукции внешнего окислительного стресса, что позволяет судить об эффективности систем антиоксидантной защиты клеток. С использованием этого метода и ингибиторного анализа нам удалось идентифицировать ферментативные пути, несущие основную нагрузку при элиминации избыточного пероксида в условиях мягкого и интенсивного окислительного стресса в МСК, что в дальнейшем может быть использовано для разработки фармпрепаратов, повышающих стрессоустойчивость клеток.

2) Мы доказали, что HyPer может быть также использован для характеристики внутриклеточной дисульфидредуктазной активности. Разработанный нами метод позволил сравнить дисульфидредуктазную активность в МСК и фибробластах человека с клетками малигнизированного фенотипа (K-562 и HeLa) и доказать, что тиоредоксин-зависимая дисульфидредуктазная активность повышена в опухолевых клетках. Помимо

этого, мы обнаружили, что тиоредоксин-зависимая активность снижается при развитии репликативного старения МСК. Разработанный протокол может применяться для характеристики активности внутриклеточных дисульфидредуктаз при различных метаболических дисбалансах.

3) С использованием pH-чувствительного биосенсора *SypHer* мы обнаружили закисление цитоплазмы МСК при развитии клеточной сенесценции, что может быть использовано в дальнейшем для фундаментальных исследований в области биологии старения МСК.

Исследования проводились при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант 21-74-20178).

Список литературы

1. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., et al. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide // *Nat Methods*. 2006. Vol. 3. P. 281–286. doi: 10.1038/nmeth866
2. Bilan D.S., Belousov V.V. HyPer family probes: State of the art // *Antioxidants Redox Signal*. 2016. Vol. 24, N 13. P. 731–751. doi: 10.1089/ars.2015.6586

Лядова И.В.¹ ✉, Шевелева О.Н.¹, Григорьева Е.В.², Медведев С.П.²

Генетически модифицированные iPSC: модель для изучения роли отдельных генов в регуляции дифференцировки и функции иммунокомпетентных клеток

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

² ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ ivlyadova@mail.ru

Аннотация. Рассматриваются методические подходы, используемые для получения из iPSC различных популяций иммунных клеток человека, обсуждаются перспективы развития этого направления, а также приводятся результаты собственных исследований по генерации, генетической модификации и анализу макрофагов человека, полученных из iPSC.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; макрофаги; дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в макрофаги; CRISPR/Cas9; интерферон- β ; TNFAIP3.

Lyadova I.V.¹, Sheveleva O.N.¹, Grigoreva E.V.², Medvedev S.P.²

Genetically-modified iPSCs as a model to explore the role of individual genes in the regulation of immune cell differentiation and function

Koltzov Institute of Developmental Biology of RAS, Moscow, Russia

Federal Research Center Institute of cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. In the presentation new discuss current approaches used to generate various populations of human immune cells from iPSCs, the prospects of these studies, and we also present the results of our studies focused on the generation, genetic modification and analysis of iPSC-derived human macrophages.

Keywords: induced pluripotent stem cells; macrophages; the differentiation of human induced pluripotent stem cells into macrophages; CRISPR/Cas9; interferon- β ; TNFAIP3.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC) могут быть получены из различных клеточных источников и дифференцированы в различные клеточные типы. Это создает основу использования iPSC в разнообразных целях, включая фундаментальные исследования биологии различных клеток, моделирование эмбриональных стадий дифференцировки, создание клеточных моделей различных заболеваний, а также получение продуктов для клеточной и генной терапии. С точки зрения всех перечисленных направлений большие перспективы имеет дифференцировка iPSC в различные популяции иммунокомпетентных клеток, в том числе — в макрофаги. Макрофаги — клетки врожденного иммунитета, локализованные в тканях и выполняющие функции поддержания гомеостаза организма. Тканерезидентные макрофаги образуются в эмбриогенезе на стадиях примитивного и раннего дефинитивного гемопоэза, отличающегося от постнатального костномозгового кроветворения, и в дальнейшем поддерживаются за счет самообновления. Дифференцировка iPSC в МФ (iPSC-МФ) *in vitro* позволяет моделировать эмбриональные стадии гемопоэза человека и получать МФ, имеющие характеристики тканевых. В докладе рассматриваются методические подходы, используемые для получения из iPSC различных популяций клеток врожденного иммунитета человека, обсуждаются перспективы развития этого направления, а также приводятся результаты собственных исследований по генерации, генетической модификации и анализу iPSC-МФ.

Проведено сравнение различных методов генерации iPСК-МФ, оптимизирован протокол получения iPСК-МФ. Впервые показано, что при использовании различных протоколов дифференцировки, транскриптомные профили дифференцирующихся клеток и конечных iPСК-МФ различаются, в частности, по экспрессии генов воспалительного ответа, липидного метаболизма и антигенной презентации. Предложены маркеры, позволяющие на ранних стадиях дифференцировки прогнозировать ее эффективность (CD43 и CD309). Охарактеризованы свойства iPСК-МФ: высокая фагоцитарная активность (показано на моделях фагоцитоза флуоресцентно-меченых бус, *E.coli*, *Chlamydia trachomatis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis BCG*); реактивность на воспалительные стимулы (ЛПС, IFN- β); высокая антибактериальная активность (*M. tuberculosis*, *M. bovis BCG*). Выявлены фенотипические и функциональные особенности iPСК-МФ по сравнению с макрофагами, полученными из моноцитов крови (низкая экспрессия HLA-DR, высокая антимикобактериальная активность). Модель генерации iPСК-МФ использована для получения макрофагов с сверхэкспрессией генов, кодирующих факторы, участвующие в регуляции воспаления (TNF- α -induced protein 3, TNFAIP3 или A20), развитии противобактериального ответа (кателицидин), в противовирусном и противоопухолевом иммунном ответе (интерферон I типа IFN- β). С использованием этих моделей: (i) исследована стабильность экспрессии гена интереса в процессе гемопоэтической дифференцировки iPСК с конститутивной и доксициклин-индуцированной сверхэкспрессией таргетного гена; (ii) впервые описаны особенности динамики экспрессии TNFAIP3 в процессе гемопоэтической дифференцировки: низкая экспрессия в стволовых клетках, высокий уровень экспрессии в дифференцирующихся клетках, резкое снижение экспрессии на стадии образования макрофагов; (iii) обнаружено, что в отличие от других популяций клеток, в том числе — моноцитов, в макрофагах экспрессируется низкомолекулярная (~70kDa) форма белка TNFAIP3, что, очевидно, имеет важное биологическое значение; (iv) выявлено, что сверхэкспрессия интерферона β (*IFNB*) на стадии iPСК и в процессе их спонтанной и направленной дифференцировки приводит к нарушению экспрессии генов, ассоциированных с нейроэктодермальной дифференцировкой (*PAX6*, *LHX2*), что свидетельствует о негативных эффектах IFN- β на формирование нейральных клеоц-предшественников и их дифференцировки.

В целом, получение генетически модифицированных iPСК и их дифференцировка в iPСК-МФ и другие гемопоэтические клетки является ценной моделью для изучения влияния различных генетических факторов на процесс клеточной дифференцировки и получения иммунных клеток со стойкой генетической модификацией. Созданная платформа получения iPСК-МФ в перспективе может быть использована, в том числе, для получения клеточных терапевтических препаратов.

Работа поддержана Минобрнауки России (№ 075-15-2021-1075).

Лямина С.В.✉, Иванова Т.И., Кожевникова Е.О., Калиш С.В., Слепов Ю.К.

Эффекты условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на изменения протеомных сигнатур и провоспалительный потенциал клеток

ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России, Москва, Россия

✉ svlvs@mail.ru

Аннотация. Изменение условий культивирования и переход МСК в состояние сенесцентности способны значительно изменить клеточный протеом, что может негативно сказаться на окружающих тканях при дальнейшем использовании МСК и их компонентов.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; сенесценс; протеом; физиоксия; инфламейджинг.

Lyamina S.V., Ivanova T.I., Kozhevnikova E.O., Kalish S.V., Slepov Yu.K.

Effect of mesenchymal stem cell culture conditions on proteomic signature changes and proinflammatory cell potential

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Russian University of Medicine” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Culture environment effects and senescent phenotype in MSCs can significantly change the cells' proteome. This promotes negative effects in surrounding tissues while further use of MSCs and their components.

Keywords: mesenchymal stem cells; senescence; proteome; physioxia; inflammaging.

Применение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для целей регенеративной медицины описано в значительном числе экспериментальных и клинических исследований, при этом ряд результатов сопровождается данными о побочных эффектах и неблагоприятных событиях клеточной терапии, вызванных в том числе провоспалительным профилем секрета МСК [1]. Очевидно, что, будучи представленными в различных тканях, МСК являются как регуляторами, так и участниками локальной регенерации и иммуномодуляции, а их секретом может быть либо частью терапевтического механизма, либо ключевым триггером для последующего изменения ткани. После выделения и при культивировании *in vitro* МСК способны изменять свои функциональные характеристики, а реакция клеток на различные внешние и внутренние стимулы может привести к индукции старения, преждевременному старению и состояниям, связанным с инфламейджингом. Цель исследования заключалась в оценке возможных изменений протеома МСК, выделенных из жировой ткани ((МСКж)) при изменении условий культивирования и моделировании сенесцентного состояния, характерного для воспалительных и возраст-ассоциированных заболеваний. Материалы и методы: Контрольные МСКж после выделения культивировали в бессывороточной среде (STEMin1, HiMedia) в стандартных клеточных условиях (37°C, 5% CO₂, 20% O₂), а также в условиях пониженного содержания кислорода (37°C, 5% CO₂, 6,5% O₂), при этом выбранный режим является физиоксией для МСКж. Сенесцентные изменения МСК были индуцированы повреждением ДНК (доксорубин 0,2 мкл/мл), стресс-индуцированный преждевременный сенесценс (СИПС) индуцирован H₂O₂ 3% 0,35 мкл/мл. Указанные группы МСК культивировали в бессывороточной среде (STEMin1, HiMedia) в двух режимах — стандартных культуральных условиях и условиях физиоксии. Продолжительность эксперимента составила 10 дней. Сенесцентные изменения клеток документированы классическим методом окрашивания на β-галактозидазу. Подготовка образцов для протеомного анализа выполнена с использованием FASP-протокола. Протеомный анализ выполнен на ВЭЖХ

системе Ultimate 3000 RSLCnano («Thermo Scientific», США) соединенной с масс-спектрометром Q-exactive HFX («Thermo Scientific», США). Для идентификации белков был использован пакет программ MaxQuant (v2.6.2.0). Аннотация белков и статистический анализ проводились с помощью Perseus (v2.0.11). Результаты: При сравнении протеомных сигнатур МСКж контрольной группы (37°C, 5% CO₂, 20% O₂), и группы МСК физиоксии отмечено, что физиоксия приводила к значительному увеличению уровней MIF, LAMP1, LAMP2 и менее выраженному повышению COTL1 и 14-3-3 protein epsilon. В МСКж контрольной группы отмечен высокий уровень Tubulin beta chain, Gelsolin, Parkinson disease protein 7, Peroxiredoxin-6, что характерно для сенесцентных клеток [2]. Тренд результатов в группах индукции сенесценса был сопоставим. Так, в группе МСКж H₂O₂ физиоксии в сравнении с МСКж H₂O₂ значимо повышены спектральные показатели экспрессии MIF, что согласуется с данными для группы МСКж физиоксии и литературными данными для клеток других типов [3]. В группе МСКж H₂O₂ при стандартных культуральных условиях также значимо возрастал уровень таких компонентов SASP, как COTL1, tubulin beta chain, tubulin alpha-1C chain, thioredoxin domain-containing protein 17, MVP, 14-3-3 protein epsilon. Выявленное повышение уровней лизосомальных белков LAMP, CTSB в группе МСКж H₂O₂ физиоксия свидетельствует о том, что гипоксические условия не способны полностью ингибировать процессы старения в клетках при воздействии на них стрессовых стимулов. Подобная тенденция отмечена и в группах с доксорубицином.

Выводы. Полученные данные позволяют предположить значимость выбора условий для культивирования МСКж в контексте влияния на протеом клеток, а также определенные преимущества культивирования МСК в условиях физиоксии. Полученные результаты могут быть значимы для прогнозирования эффектов применения МСК и их секретома в качестве терапевтического инструмента.

Список литературы

1. Baranovskii D.S., Klabukov I.D., Arguchinskaya N.V., et al. Adverse events, side effects and complications in mesenchymal stromal cell-based therapies // *Stem Cell Investig.* 2022. Vol. 9. P. 1–12. doi: 10.21037/sci-2022-025
2. Özcan S., Alessio N., Acar M.B., et al. Unbiased analysis of senescence associated secretory phenotype (SASP) to identify common components following different genotoxic stresses // *Aging (Albany NY)*. 2016. Vol. 8, N 7. P. 1316–1329. doi: 10.18632/aging.100971
3. Gaber T., Schellmann S., Erekul K.B., et al. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible factor-1 alpha function and differentially influences human CD4⁺ T cell proliferation under hypoxia // *J Immunol.* 2011. Vol. 186, N 2. P. 764–774. doi: 10.4049/jimmunol.0903421
4. Rovira M., Sereda R., Pladevall-Morera D., et al. The lysosomal proteome of senescent cells contributes to the senescence secretome // *Aging Cell.* 2022. Vol. 21, N 10. ID e13707. doi: 10.1111/acer.13707

Мадонов К.С.✉, Балыкова Л.А., Бродовская Е.П., Власов А.П., Абелова А.А., Власова Т.И.

Оценка *in vitro* эффектов обогащённой тромбоцитами плазмы крови пациентов молодого и пожилого возраста

Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, Россия

✉ mks-34@yandex.ru

Аннотация. Изучено влияние на культуру фибробластов кожи человека обогащенной тромбоцитами плазмы от доноров 30–40 лет (выявлено повышение метаболической активности и жизнеспособности клеток и умеренное прооксидантное влияние в первые сутки эксперимента), 60–70 лет (выявлено угнетение метаболической активности, увеличение процента некроза).

Ключевые слова: регенеративная медицина; оперативная хирургия; заживление ран; обогащенная тромбоцитами плазма.

Madonov K.S., Balykova L.A., Brodovskaya E.P., Vlasov A.P., Abelova A.A., Vlasova T.I.

In vitro evaluation of the effects of platelet-rich plasma in young and elderly patients

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education National Research Ogarev Mordovia State University, Saransk, Russia

Abstract. The authors examine the effects of platelet-rich plasma in a human skin fibroblast culture: by donors of 30–40 years old (they reveal a positive effect on metabolic activity and cell viability) and 60–70 years old (they reveal a negative effect on the 1st day of the experiment).

Keywords: regenerative medicine; operative surgery; wound healing; platelet-rich plasma.

Одной из актуальных проблем хирургии является регенерация тканей, особенно при необходимости выполнения традиционного лапаротомного оперативного доступа, при котором высок (до 60%) риск развития осложнений со стороны послеоперационной раны, снижающих качество жизни пациента и увеличивающих продолжительность его пребывания в стационаре. Как следствие, ведется активный научный поиск новых более эффективных подходов к оценке состояния послеоперационных ран и к управлению процессом заживления. Одним из таких подходов является применение обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP), однако отдельные аспекты данного метода требуют дополнительного изучения, в том числе применение PRP в терапии пациентов пожилого возраста [1]. Возрастное снижение репаративного потенциала тканей связывают с формированием сенесцентного фенотипа клеток (SASP), в результате чего последние предположительно обретают способность к паракринной регуляции клеток микроокружения и иммунцитов, что согласно современной концепции антагонистической плейотропии клеточного старения является неоднозначным с позиций физиологии и патологии регенерации [2]. Таким образом, изучение клеточного ответа *in vitro* после стимуляции клеточной культуры PRP доноров разного возраста необходимо для понимания роли SASP в регенерации тканей и определения эффективности PRP-терапии пациентов пожилого возраста.

Цель исследования — изучение в возрастном аспекте регенеративного потенциала PRP *in vitro* посредством оценки метаболической, пролиферативной и миграционной активности клеток культуры фибробластов кожи человека после их стимуляции PRP доноров разного возраста. В исследовании приняли участие 20 пациентов, разделенные на 2 группы по возрасту: 30–40 лет ($n = 10$, М/Ж = 5/5), 60–70 лет ($n = 10$, М/Ж = 5/5). Проводили контроль отсутствия острых или хронических декомпенсированных соматических и острых или хронических инфекционных заболеваний, а также онкопатологии, беременности, лактации

и послеоперационного состояния. Проводили контроль показателей цельной крови. Исследование проводили на клеточной линии hTERT-HDFa (d220) иммортализованных фибробластов кожи человека (ФКЧ), культивировали согласно паспорту культуры (УНУ «Коллекция клеточных культур» ИБР РАН). В опытные лунки вносили размороженную и активированную 10% CaCl₂ (20 μл/мл) PRP в концентрации 10%. Отрицательный контроль — лунки без PRP. Положительный контроль — лунки с 10% FBS. Оценивали метаболическую активность и жизнеспособность клеток — МТТ-тест через 24/48/72 часа эксперимента; вид клеточной смерти определяли методом флуоресцентной микроскопии после окрашивания, активность продукции активных форм кислорода (АФК) через 2/4/24 ч экс.; пролиферацию и миграцию клеток — scratch assay с оценкой закрытия дефекта через 0/24 ч экс. при помощи инвертированного микроскопа Микромед-И, камеры Topcam и программы Fiji ImageJ. Статистически обрабатывали данные при помощи программы StatTech v. 4.1.7: различия считали достоверными при $p < 0,05$.

По данным МТТ теста установлено, что метаболическая активность и жизнеспособность ФКЧ в первые сутки эксперимента зависят от возраста донора PRP. Выявлено негативное влияние PRP доноров пожилого возраста, сопровождающееся большей частотой некроза и апоптоза (в лунках с PRP доноров молодого возраста частота апоптоза достоверно ниже, а некроз не выявляется), что может быть связано с повышенным содержанием в данной PRP токсинов и провоспалительных цитокинов, наличием SASP и сниженным содержанием факторов роста [4, 5]. На вторые и третьи сутки эксперимента достоверных межгрупповых различий по метаболической активности и жизнеспособности ФКЧ не выявлено, что может быть связано с включением компенсаторных систем и адаптацией ФКЧ к новой среде. Также не выявлено достоверных межгрупповых различий по миграционной активности ФКЧ. Что касается PRP пациентов молодого возраста, выявлено ее прооксидантное влияние с повышением активности синтеза АФК в первые сутки эксперимента с последующим снижением такой активности, что может быть связано с физиологическими эффектами свободнорадикального окисления и его ролью в функционировании внутриклеточных сигнальных путей и генерации митогенного ответа при низких/умеренных концентрациях АФК. PRP доноров пожилого возраста не продемонстрировала выраженного прооксидантного влияния, однако при этом наблюдалась тенденция к повышению активности синтеза АФК в первые сутки эксперимента.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-00278, <https://rscf.ru/project/24-25-00278/>.

Список литературы

1. Everts P., Onishi K., Jayaram P., et al. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020 // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 20. ID 7794. doi: 10.3390/ijms21207794
2. Власова Т.И., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелий и старение: механизмы формирования сенесцентного фенотипа эндотелиальных клеток // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. 2023. Т. 22, № 3. С. 19–33. EDN: EZNJPA doi: 10.24884/1682-6655-2023-22-3-19-33
3. Idris M., Kusuma I., Juniarti J. Effect of platelet-rich plasma on fibroblasts induced by lipopolysaccharide: in vitro study for wound healing // *Curr Biomed*. 2023. Vol. 2, N 1. P. 36–44. doi: 10.29244/currbiomed.2.1.36-44
4. Giraldo C.E., López C., Álvarez M.E., et al. Effects of the breed, sex and age on cellular content and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel // *BMC Vet Res*. 2013. Vol. 9. ID 29. doi: 10.1186/1746-6148-9-29
5. Van Deursen J.M. The role of senescent cells in ageing // *Nature*. 2014. Vol. 509. P. 439–446. doi: 10.1038/nature13193

Майорова В.Е.✉, Моллаев М.Д., Вихрева П.Н., Кибардин А.В., Масчан М.А., Ларин С.С.

Последовательности натуральных лигандов в роли узнающего домена CAR, специфичных в отношении мембранных рецепторов

НМИЦ ДГОИ им. Рогачева, Москва, Россия

✉ maiorova.varvara@yandex.ru

Аннотация. Нароботан рекомбинантный Flt3-L27P-лиганд, протестирована его специфическая биологическая активность в сравнении с Flt3-лигандом дикого типа. Получены безантительные Flt3m-CAR T-клетки, узнающая часть Flt3m-CAR которых состоит из Flt3-L27P-лиганда, протестированы их эффективность и специфичность.

Ключевые слова: безантительные CAR T; ОМЛ; Flt3; Flt3-L27P-лиганд.

Maierova V.E., Mollaev M.D., Vikhreva P.N., Kibardin A.V., Maschan M.A., Larin S.S.

Natural ligands as recognizing domain of CAR specific to membrane receptors

Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russia

Abstract. Recombinant Flt3Lg-L27P specific biological activity was tested in comparison with wild-type Flt3Lg. Flt3m-CAR construct coding recognizing domain consisted of Flt3Lg-L27P sequence. Flt3m-CAR T cells efficacy and specificity have been evaluated.

Keywords: natural-ligand CAR T; AML; Flt3; Flt3-L27P-ligand.

Современные методы лечения опухолевых заболеваний предусматривают использование таргетных клеточных препаратов с химерными антигенными рецепторами — CAR T-клетки. Традиционно внеклеточная часть CAR, узнающая опухолеассоциированную молекулу-мишень, состоит из одноцепочечного фрагмента вариабельной части антитела (scFv). Процесс подбора оптимальной последовательности scFv включает оптимизацию аффинности узнавания молекулы-мишени, подбор линкеров между доменами scFv, а также требует тестирования специфичности узнавания молекулы-мишени итоговой последовательностью.

Тенденцией последнего времени считается использовать в составе CAR последовательность натурального лиганда к молекуле-мишени вместо фрагмента scFv. Конкретно, таргетирование рецепторов факторов роста с использованием последовательности натурального лиганда потенциально может позволить добиться высокой специфичности узнавания молекулы-мишени и значительно ускорить процесс разработки CAR-конструкций, специфичных к новым опухолевым антигенам.

Однако при таргетировании мембранных рецепторов с использованием последовательностей их натуральных лигандов нельзя забывать, что при узнавании молекулы-мишени внеклеточным доменом CAR — лигандом — может происходить активация рецептора на поверхности клетки-мишени. Следовательно, при разработке новых генетических конструкций, кодирующих безантительные CAR с последовательностью натурального лиганда, необходимо учитывать биологию взаимодействия каждой конкретной пары лиганд-рецептор.

Молекулой-мишенью для настоящей работы был выбран тирозинкиназный рецептор Flt3. Flt3 гиперпредставлен на поверхности бластных клеток в большинстве случаев острого миелоидного лейкоза, что делает его перспективной мишенью для таргетной иммунотерапии. Натуральный лиганд Flt3 — Flt3-лиганд — узнает рецептор с высокой аффинностью и запускает каскад внутриклеточных пролиферативных сигнальных

путей. Точечная замена L27P последовательности Flt3-лиганда не влияла на связывание с рецептором, но значительно снижала биоактивность белка на мышиной *in vitro* модели [1].

В ходе работы, впервые с использованием клеток-продуцентов млекопитающих, наработан и очищен рекомбинантный Flt3-лиганд человека, содержащий точечную замену L27P. Впервые создана модельная система для тестирования специфической биологической активности Flt3-лиганда по стимулированной пролиферации клеток THP-1. Протестирована биологическая активность Flt3-L27P-лиганда ($ED_{50} = 10$ нг/мл) в сравнении с рекомбинантным Flt3-лигандом дикого типа ($ED_{50} = 0,3$ нг/мл). Точечная замена L27P значительно снижала биологическую активность исследуемого белка.

Получена генетическая конструкция, кодирующая безантительный Flt3m-CAR с полноразмерной последовательностью Flt3-L27P-лиганда, получены Flt3m-CAR Т-клетки и протестированы их цитотоксичность и специфичность на модельных клеточных линиях THP-1 и U937. Создана модель неактивных Flt3m-CAR Jurkat клеток, не проявлявших цитотоксичности в отношении Flt3-позитивных клеток THP-1, что подтверждает необходимость активации Т-клеточных механизмов киллинга Flt3m-CAR Т-клеток для элиминирования Flt3-позитивных клеток-мишеней. Показана конкуренция за сайты связывания Flt3 между Flt3m-CAR Т-клетками и растворенным Flt3-лигандом дикого типа, из чего можно сделать вывод об участии сайта связывания Flt3:Flt3-лиганда в узнавании Flt3m-CAR Т-клетками клеток-мишеней. Показано, что избыток растворенного Flt3-L27P-лиганда не влияло на цитотоксичность Flt3m-CAR Т-клеток в отношении Flt3-позитивных клеток-мишеней.

Суммируя, безантительные Flt3m-CAR Т-клетки специфически элиминировали Flt3-позитивные клетки THP-1 и не нарушали пролиферацию Flt3-негативных клеток U937. Узнавание химерным рецептором Flt3m-CAR Т-клеток рецептора Flt3 на поверхности клеток-мишеней происходило с участием интерфейса взаимодействия Flt3:Flt3-лиганд, что указывает на высокую специфичность безантительных Flt3m-CAR Т-клеток.

Список литературы

1. Graddis T.J., Brasel K., Friend D., et al. Structure-function analysis of Flt3 ligand-Flt3 receptor interactions using a rapid functional screen // J Biol Chem. 1998. Vol. 273, N 28. P. 17626–17633. doi: 10.1074/jbc.273.28.17626

Макаров М.С.¹ ✉, Сторожева М.В.¹, Пономарев И.Н.¹, Боровкова Н.В.^{1–3}, Буланов А.Ю.¹

Биологический потенциал аллогенных тромбоцитов, выделенных из цельной крови: перспективы использования в регенеративной медицине

¹ ГБУЗ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва, Россия

² ФGAOY «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

³ ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, Москва, Россия

✉ mcsimmc@yandex.ru

Аннотация. Исследовали морфофункциональные особенности и цитокиновый состав тромбоцитов в составе тромбо-лейкоцитарных концентратов (ТЛК), выделенных из дозы цельной крови доноров. ТЛК имеют сниженный уровень тромбоцитов с гранулами, при этом их общий функциональный потенциал и цитокиновый состав сохраняется.

Ключевые слова: тромбо-лейкоцитарные концентраты; тромбоциты; гранулы; цитокины; факторы роста.

Makarov M.S.¹, Storozheva M.V.¹, Ponomarev I.N.¹, Borovkova N.V.^{1–3}, Bulanov A.Yu.¹

The biological potential of allogeneic platelets, isolated from whole blood: prospects for use in regenerative medicine

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Russian Medical Academy of Continuous Postgraduate Education, Moscow, Russia

Abstract. Morphofunctional features and cytokine content of platelets in buffy coats (BC), isolated from whole donors' blood, were studied. BCs had reduced level of platelets with granules, while their overall functional potential and cytokine content were preserved.

Keywords: buffy coats; platelets; granules; cytokines; growth factors.

Тромбоциты человека содержат широкий спектр биологически активных веществ, которые имеют большое значение для стимуляции репаративных и регенеративных процессов. В настоящее время препараты на основе аллогенных тромбоцитов редко используются в регенеративной медицине, тем не менее, в ряде случаев аллогенные тромбоциты могут быть ценным резервуаром репаративных и регенеративных факторов. Одним из потенциальных источников тромбоцитарных компонентов являются тромбо-лейкоцитарные концентраты (ТЛК), выделенные в процессе сепарации цельной донорской крови. Целью работы было оценить морфофункциональный статус клеток и цитокиновый состав тромбо-лейкоцитарных концентратов, выделенных из цельной крови доноров. ТЛК выделяли из цельной крови доноров на аппарате Reveos в стандартные пластиковые трансфузионные пакеты с консервантом SSP и экспонировали на шейкере при 20–22°C до получения отрицательных результатов теста на наличие в крови доноров гемотрансмиссивных инфекций. С момента выделения ТЛК до начала их исследования во всех случаях проходило 2 суток. Цитокиновый состав оценивали в исходных ТЛК, а также в ТЛК, полученных после отмывания клеток от исходной среды (ОтмТр), и в бедной тромбоцитами плазме (БедПл). Для получения ОтмТр и БедПл исходные ТЛК центрифугировали при 700 g в течение 10–17 минут для осаждения клеток, отбирали надосадок (БедПл) и ресуспендировали осадок клеток в бесплазменной среде. Цитокиновый состав оценивали с помощью мультиплексного анализа на платформе Luminex 200 (технология xMAP), используя набор EMD

Millipore's MILLIPLEXmap HUMAN Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel Kit. Определяли концентрацию фактора роста фибробластов (FGF-2), эпидермального фактора роста (EGF), интерлейкинов 1-бета (IL1-beta) и 8 (IL8), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в пг/мл. Морфофункциональный анализ тромбоцитов проводили с помощью оригинального метода, основанного на исследовании витально окрашенных клеток с помощью флуоресцентной микроскопии. Для оценки качества клеток в составе ТЛК оценивали следующие параметры: концентрация тромбоцитов, $\times 10^9/\text{л}$; концентрация лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$; уровень тромбоцитов с гранулами, $D_{\text{тр.гр.}}$, % (норма 35–75 баллов); адгезивная активность тромбоцитов, ААТ, в баллах (норма 30–75 баллов). Кроме того, оценивали способность ТЛК к образованию тромбофибринового сгустка (ТФ) при 20–22 °С. Для образования ТФ в ТЛК вносили раствор 10% хлорида кальция до конечной концентрации кальция 35–45 мМ и оценивали время образования ТФ. Для оценки различий использовали критерий Вилкоксона для связанных выборок. Различия значений считали достоверными при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$). Концентрация тромбоцитов в ТЛК через 2 суток после выделения составляла 1877 [1679; 2025] $\times 10^9/\text{л}$, концентрация лейкоцитов — 6,6 [5,3; 7,9] $\times 10^9/\text{л}$. Морфофункциональный статус тромбоцитов ТЛК был изначально снижен по сравнению с нормой: значения $D_{\text{тр.гр.}}$ составили 23 [18; 25]%, ААТ — 21 [15; 25] баллов. Во многих ТЛК выявлялись тромбоцитарные конгломераты, которые не распались при перемешивании на шейкере, в составе таких конгломератов все тромбоциты или подавляющая часть тромбоцитов не содержали гранул. Также в ТЛК можно было выявить крупные тромбоцитарные гранулы диаметром 500–700 мкм, расположенные отдельно от тромбоцитов или связанные с тромбоцитами тонким мостиком цитоплазмы. Тем не менее, в 70% ТЛК с уровнем $D_{\text{тр.гр.}}$ 21% и выше при 20–22 °С удавалось получить ТФ в течение 20–30 мин. В ТЛК с $D_{\text{тр.гр.}}$ ниже 20% ТФ при 20–22 °С никогда не формировался. Таким образом, тромбоциты ТЛК могут обладать повышенной реактивностью даже при невысоком содержании биологически полноценных тромбоцитов. В лизатах ТЛК уровень EGF составил 2050 [1290; 2481] пг/мл, FGF-2 — 1822 [901; 3100] пг/мл, IL-1beta — 12 [10; 16] пг/мл, IL8 — 251 [135; 368] пг/мл, VEGF — 668 [125; 1162] пг/мл. В ОтмТр эти значения соответственно составили 1161 [1064; 1261], 2368 [1192; 3951], 8 [6; 14], 61 [18; 125] и 1056 [310; 1890] пг/мл, в БедПл — 455 [262; 650], 514 [421; 581], 13 [10; 18], 284 [135; 382] и 83 [0; 381] пг/мл. Уровень про-воспалительных цитокинов значимо не различался между ТЛК и БедПл, тогда как в ОтмТр содержание IL1-beta и IL8 было снижено в 1,5 и 4,1 раза ($p < 0,05$). Напротив, уровень ростовых факторов VEGF и FGF-2 в ОтмТр превышал аналогичные значения в ТЛК в 1,6 и 1,3 раза ($p < 0,05$). Стоит особо отметить наличие в БедПл довольно высоких значений EGF и FGF-2, что может быть обусловлено присутствием в среде ТЛК тромбоцитарных гранул, а также их компонентов, выделившихся в результате центрифугирования. Таким образом, аллогенные тромбоциты, выделенные из дозы крови, содержат большое количество цитокинов как в составе тромбоцитов, так и в составе бесклеточной среды. Отмывка от плазмы снижает уровень про-воспалительных цитокинов в лизатах ТЛК. При низких морфофункциональных значениях аллогенные тромбоциты сохраняют общий функциональный потенциал и потенциально могут быть использованы при создании биологических препаратов.

Макеева В.С.¹ ✉, Малахова А.А.¹, Дырхеева Н.С.², Закиан С.М.¹

Влияние ингибиторов PARP1 на развитие патологических процессов в нейральных производных, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Хантингтона

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

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

✉ vladamakkeeva@gmail.com

Аннотация. Одним из потенциальных средств терапии болезни Хантингтона являются ингибиторы фермента PARP1. Положительные результаты его применения на мышинной модели болезни Хантингтона сподвигли на тестирование его на релевантной модели на основе ИПСК пациента с данным заболеванием.

Ключевые слова: болезнь Хантингтона; фермент PARP; срединные шипиковые нейроны; ИПСК; ингибиторы.

Makeeva V.S.¹, Malakhova A.A.¹, Dyrkheeva N.S.², Zakian S.M.¹

Effect of PARP1 inhibitors on the development of pathological processes in neural derivatives differentiated from Huntington's disease patient iPSCs

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. One of the potential treatments for Huntington's disease is PARP1 inhibitors. Positive results of its use in a mouse model of Huntington's disease prompted testing it in a relevant model based on iPSCs from a patient with Huntington's disease.

Keywords: Huntington's disease; PARP enzyme; medium spiny neurons; iPSCs; inhibitors.

Болезнь Хантингтона — аутосомно-доминантное нейродегенеративное заболевание, вызванное экспансией CAG повторов в первом экзоне гена *HTT*. Удлинение полиглутаминового тракта белка приводит к aberrantным взаимодействиям мутантного хантингтина, образованию токсичных для клетки агрегатов и N-концевых фрагментов белка [2]. Благодаря накопленной информации о механизмах развития болезни активно ведется разработка эффективного средства терапии.

Одним из подходов к разработке лекарственного препарата является использование уже разработанных препаратов для терапии нового заболевания. Длительное повреждение ДНК в ходе окислительного стресса приводит к смерти нейронов, известной как партанатос, обусловленной ферментом репарации PARP1 [3]. Этот фермент в норме синтезирует сигнальные метки в виде поли-АДФ-рибозу из NAD⁺ для привлечения и активации машины репарации. Гиперактивность фермента приводит к появлению свободных PAR-молекул, которые инициируют транслокацию апоптоз-индуцирующего фактора AIF из митохондрии в ядро, и запуску гибели клетки по механизму партанатоса. Гиперактивация PARP1 также приводит к истощению пула NAD⁺ в клетке, что нарушает энергетический метаболизм и функционирование других NAD-зависимых ферментов.

Ингибирование активности фермента на мышинных моделях болезни Хантингтона приводит к снижению темпов гибели нейронов и проявления симптомов болезни [1].

Для подтверждения действия ингибиторов PARP мы получили модель развития болезни Хантингтона на основе ИПСК пациента с 46 CAG повторами в гене *HTT*. Используя технологии геномного

редактирования CRISPR/Cas9 и Sleeping Beauty, получены трансгенные линии ИПСК с тетрациклин-активируемой экспрессией сенсора XBP1-TagRFP, сигнализирующего о стрессе ЭПР флуоресценцией в красном спектре.

Для детекции эффекта ингибиторов PARP на развитие патологических процессов, ИПСК дифференцировали в срединные шипиковые нейроны [3] и обрабатывали ингибитором PARP (нирапариб).

Добавление в среду ингибиторов PARP способствовало значительному снижению уровня экспрессии *XBP1*, *CHOP*, *ATF4* в клетках линий, где наблюдался до этого их высокий уровень их мРНК.

Помимо влияния на стресс ЭПР, мы проверили как ингибитор PARP Niraparib меняет экспрессию генов, ассоциированных с болезнью Хантингтона. Для этого мы сначала оценили соответствие изменения уровня экспрессии этих генов в наших линиях СШН литературным данным. Не для всех генов происходило изменение экспрессии согласно описанным в других исследованиях результатам, при этом ингибитор давал иногда противоположный ожидаемому эффект: так он не повышал сниженную экспрессию *Rb1*, а напротив, еще больше снижал ее.

Кроме генов с подтвержденным изменением экспрессии при БХ, мы выбрали ряд генов с предположительным изменением экспрессии, показанным только на одном типе модели БХ или на постмортальных образцах мозга пациентов, на моделях других нейродегенеративных заболеваний, а также участвующие в дегенеративных процессах с участием PARP1: *NEUROD1*, *PCDH11X*, *NETO1*, *GRP78*, *YY1*. Для *NEUROD1*, *PCDH11X*, *NETO1* данные не совпали с ожидаемым результатом, но ген *GRP78* действительно имеет более высокую экспрессию относительно линии нейронов от здорового донора. Также, мы подтвердили связь PARP фермента с регуляцией экспрессии *YY1* и *GRP78*.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-15-00224.

Список литературы

1. Cardinale A., Paldino E., Giampà C., et al. PARP-1 inhibition is neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 8. doi: 10.1371/journal.pone.0134482
2. Grigor'eva E.V., Malankhanova T.B., Surumbayeva A., et al. Generation of GABAergic striatal neurons by a novel iPSC differentiation protocol enabling scalability and cryopreservation of progenitor cells // Cytotechnology. 2020. Vol. 72, N 5. P. 649–663. doi: 10.1007/s10616-020-00406-7
3. Park H., Kam T.I., Dawson T.M., et al. Poly (ADP-ribose) (PAR)-dependent cell death in neurodegenerative diseases // Int Rev Cell Mol Biol. 2020. Vol. 353. P. 1–29. doi: 10.1016/bs.ircmb.2019.12.009

Макеев О.Г.^{1,2}, Коротков А.В.^{1,2} ✉, Десятова М.А.^{1,2}, Антонова С.Б.¹, Боковой В.Д.²

Генотерапия атопического дерматита

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

✉ akorotkov64@yandex.ru

Аннотация. Атопический дерматит — распространенная патология, составляющая 20% в структуре кожных заболеваний. Для его лечения в настоящее время используются препараты системной терапии, имеющие побочные эффекты. Разработан метод терапии атопического дерматита, основанный на нанесении экзосом, включающих белок IFN- γ , на область дефекта кожи. Была достигнута высокая эффективность терапии при сокращении продолжительности лечения.

Ключевые слова: атопический дерматит; ген *IFN- γ* ; трансфекция ММСК; экзосомы.

Makeev O.G.^{1,2}, Korotkov A.V.^{1,2}, Desyatova M.A.^{1,2}, Antonova S.B.¹, Bokovoj V.D.²

Gene therapy of atopic dermatitis

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Atopic dermatitis is a common pathology, accounting for 20% of the structure of skin diseases. Systemic therapy drugs with side effects are currently being used for its treatment. A method for the treatment of atopic dermatitis has been developed based on the application of exosomes, including the IFN- γ protein, to the area of the skin defect. High efficiency of therapy was achieved while reducing the duration of treatment.

Keywords: atopic dermatitis; *IFN- γ* gene; MMSC transfection; exosomes.

Атопический дерматит (АтД) — одно из наиболее распространённых воспалительных заболеваний кожи, которое поражает каждого пятого ребенка и до 9% взрослых по всему миру. В промышленно развитых странах в течение последних трёх десятилетий распространенность АтД возросла в 3 раза. Важным механизмом развития АтД является нарушение иммунного ответа, зависящее не от количества Т-лимфоцитов, а от изменения направленности дифференцировки Th0 и профиля секретируемых цитокинов. При этом развитие АтД происходит при участии клона Th2-хелперов с преобладанием Th2-иммунного ответа, предусматривающего секрецию интерлейкинов 4, 5, 10 и 13. В свою очередь считается, что Th2 — ответ стимулирует В-клеточный гуморальный иммунитет и выступает синергистом в отношении ПГ E2 и оксида азота. Примечательно, что в Th2-воспалении некоторое участие принимают и другие клоны Т-хелперов, такие как Treg (IL10, TGF beta), Th17 (IL17, 21, 22), но особенно Th1, секретирующие IFN- γ , IL2 и TNF- α , чье участие в фенотипических проявлениях атопических заболеваний хорошо известно.

Отдельной проблемой терапии АтД являются поиск средств таргетной доставки, применение которых способно исключить системность эффектов препаратов и, тем самым, преодолеть основные побочные эффекты. Таковым способом таргетной доставки могут являться экзосомы, которые выступают важными посредниками физиологической межклеточной коммуникации, что обеспечивается их наноразмерностью. Так же за счет применения экзосом значительно усиливается эффективность средств терапии благодаря возможности экзосом включать в своё внутреннее содержимое биологически активную полезную нагрузку, например белки, образующиеся вследствие искусственно индуцированной избыточной экспрессии генов в клетках-донорах экзосом.

Важной составляющей поиска перспективных средств терапии является неоднократно подтвержденный феномен взаимной перекрестной ингибиции пролиферации Т-хелперов между клонами Th1–Th2

Принципиальной задачей при проведении клинических исследований атопического дерматита является отнесение исследуемого контингента к тому или иному преобладающему эндотипу, установление которого не только позволяет конкретизировать механизм развития патологии, но и сформулировать подход к патогенетическому лечению. В ходе исследований пациентов с атопическим дерматитом было установлено преобладание эндотипа Th2-иммунного ответа, сопровождавшегося значительным изменением эпигенетического ландшафта (снижение уровня ацетилирования гистонов и повышение уровня метилирования ДНК), что коррелировало с существенным снижением концентрации IFN- γ , способного избирательно подавлять реакции Th2-эндотипа.

В настоящее время не представляется возможным направленно и безопасно для пациента изменять эпигенетическую регуляцию экспрессии отдельного гена, альтернативой является увеличение его копий. Последнее достигается внедрением в клетку генноинженерных конструкций с полезным геном *IFN- γ* , а с целью безопасной и эффективной доставки его продукта — IFN- γ в кожу — экзосомы, поскольку прямое применение препаратов на основе IFN- γ зачастую не оказывает значимого эффекта.

В ходе выполненных исследований на модели атопического дерматита у лабораторных животных показано, что применение этого подхода нормализует концентрацию иммуноглобулинов и цитокинов в крови. Проведенные пилотные клинические исследования по применению экзосом, полученных от культивируемых мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, трансфицированных плазмидой с геном *IFN- γ* на добровольцах продемонстрировали, что нормализация цитокинов сопровождается восстановлением целостности кожных покровов, а последующее наблюдение не выявило обострения течения заболевания у пациентов в течение 2 месяцев.

Макеев О.Г.^{1,2}, Шуман Е.А.^{1,2}✉, Коротков А.В.^{1,2}, Десятова М.А.^{1,2}, Антонова С.Б.¹

Гель на основе компонентов стволовых клеток для терапии повреждений кожи

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

✉ larim@mail.ru

Аннотация. Возрастные повреждения кожи и их коррекция являются важной проблемой современной медицины, главным образом вследствие утраты восстановительного потенциала клеток. Разработан гель на основе цитоплазмы стволовых клеток, продемонстрировавший высокую терапевтическую ценность в отношении коррекции возрастных и терапии различных повреждений кожи.

Ключевые слова: повреждения кожи; клеточная терапия; бесклеточная терапия.

Makeev O.G.^{1,2}, Shuman E.A.^{1,2}, Korotkov A.V.^{1,2}, Desyatova M.A.^{1,2}, Antonova S.B.¹

Gel based on stem cell components for skin damage therapy

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Age-related skin lesions and their correction are an important problem of modern medicine, mainly due to the loss of the regenerative potential of cells. A gel based on stem cell cytoplasm has been developed, which has demonstrated high therapeutic value in relation to the correction of age-related and therapy of various skin lesions.

Keywords: skin damage; cell therapy; cell-free therapy.

Возрастные повреждения кожи и их коррекция являются важной проблемой современной медицины. С течением времени и под влиянием различных факторов клетки кожи, как и весь организм, утрачивают восстановительный потенциал. В свою очередь трофические, механические и термические повреждения кожи составляют 1–2% от общего числа заболеваний в мире.

При повреждении кожи и при биологическом старении, наряду с уменьшением количества фибробластов в коже, клетки характеризуются снижением пролиферативной активности и восприимчивости (реакционно-способности) к факторам роста. В результате снижается синтез фибробластами белков коллагена и эластина, а также компонентов аморфного вещества соединительной ткани дермы и в то же время синтез металлопротеиназ, разрушающих коллаген и эластин сохраняется. Наиболее эффективным подходом к коррекции данных нарушений является заместительная клеточная терапия. Однако по ряду причин, в том числе в связи с отсутствием в России достаточной законодательной базы, для осуществления такой терапии необходим поиск альтернативных решений.

Цель исследования — разработать гель для коррекции возрастных, трофических, травматических и иных повреждений кожи.

Материалы и методы. Исследования выполняли с использованием сертифицированных линий стволовых клеток, предоставленных Европейской Коллекцией Клеточных Культур (ЕСАСС). Культивирование клеток проводили в стандартных условиях. В процессе культивирования клетки выделяют в среду экзосомы, содержащие факторы роста и цитокины, которые и являются основными действующими компонентами геля. Благодаря наноразмерности (30–100 нм) экзосомы свободно проникают внутрь клеток и предохраняют свое содержимое от ферментативного разрушения. Получаемый готовый продукт на основе экзосом

и цитоплазмы стволовых клеток проявляет паракринный эффект за счет цитокинов и факторов роста. В проведенных исследованиях приняло участие 8 женщин — добровольцев в возрасте 18–56 лет применявших гель в течение двух месяцев один раз в сутки на ночь.

Изменения состояния кожи испытуемых проводили на основе субъективных ощущений по 10-бальной шкале (0 — не изменилось, 10 — значительно улучшилось), а так же объективных параметров (рН кожи, трансэпидермальная потеря воды, толщина эпидермиса, равномерность эпидермиса, эластичность кожи, толщина дермы в щёчной зоне, трансорбитальной и периорбитальной зонах, индекс плотности дермы в щёчной зоне, трансорбитальной зонах и периорбитальной зонах, цвет кожи, однородность пигментации кожи, краснота и однородность красноты кожи, изменения текстуры кожи, поры, морщины лба, межбровья, латерального угла глаза, морщины над верхней губой, глубина и ширина носогубной складки, рубцы постакне и атрофические).

После первого нанесения геля все пациенты не испытывали каких либо неприятных ощущений, за исключением ощущения «стягивания» кожи. У всех испытуемых этот признак бесследно исчезал после второго использования препарата.

Все испытуемые после двух — трех кратного применения геля отмечали положительный косметический эффект в проблемной области, заключающийся в уменьшении выраженности крупных и мелких морщин, кожных дефектов, а также в общем оздоровлении кожи лица в области нанесения геля. Средняя оценка изменений свойств кожи среди испытуемых составила $8,18 \pm 0,2$ балла по десятибалльной шкале.

Контроль объективных параметров показал выраженную положительную тенденцию, нарастающую к концу второго месяца применения препарата.

Выводы. При применении геля наблюдается выраженный положительный косметический эффект. Полученные данные объективного контроля позволяют заключить, что последнее обусловлено активацией клеток кожи, заключающееся в возрастании синтеза компонентов внеклеточного матрикса и факторов роста, необходимых для восстановления дефектов ткани. Таким образом, возможно применение разрабатываемого геля окажет положительный эффект не только при возрастных изменениях кожи, но и при ее трофических и термических повреждениях.

Маклакова И.Ю.^{1,2} ✉, Капралов А.И.¹, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Базарный В.В.¹, Полушина Л.Г.¹

Перспектива использования фукоксантина в качестве геропротектора

¹ Уральский государственный медицинский университет, Екатеринбург, Россия

² Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

✉ makliu@mail.ru

Аннотация. Изучали свойства фукоксантина в качестве геропротектора. Получено, что у мышей, получавших фукоксантин, увеличилась продолжительность жизни, выявлено повышение двигательной активности, снижена тревожность, в сыворотке крови снижен уровень маркеров старения, повышена антиоксидантная активность.

Ключевые слова: фукоксантин; геропротектор; продолжительность жизни; маркеры старения.

Maklakova I.Yu.^{1,2}, Kapralov A.I.¹, Grebnev D.Yu.^{1,2}, Bazarnyi V.V.¹, Polushina L.G.¹

Prospects of using fucoxanthin as a geroprotector

¹ Ural State Medical University, Yekaterinburg, Russia

² Institute of Medical Cell Technologies, Yekaterinburg, Russia

Abstract. The properties of fucoxanthin as a geroprotector were studied. It was found that in mice treated with fucoxanthin, life expectancy increased, increased motor activity was revealed, anxiety was reduced, the level of aging markers in the blood serum was reduced, and antioxidant activity was increased.

Keywords: fucoxanthin; geroprotector; life expectancy; markers of aging.

Старение — это многофакторный процесс, который сопровождается комплексом изменений, приводящих к снижению функционирования органов и тканей, развитию заболеваний и, в конечном итоге, к смерти. В связи с этим актуальным является поиск геропротектора, способного препятствовать развитию заболеваний, ассоциированных со старением, увеличивать продолжительность жизни, снижать биологический возраст. Перспективным в этом отношении является препарат фукоксантин, полученный из морских водорослей, который в ряде исследований на мушках *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* продемонстрировал увеличение продолжительности жизни [1]. Кроме того, известно, что фукоксантин обладает гепатопротекторным действием, противоопухолевым, противодиабетическим, а также противовоспалительным [2].

Исследования проведены на 60 лабораторных мышах-самцах. Было выделено 2 группы мышей, по 20 мышей в каждой группе для оценки когнитивного статуса и продолжительности жизни. 1 группа — мыши, которые с 10 мес. возраста получали фукоксантин в течение 8 мес. в дозе 20 мг/кг массы в сутки. Фукоксантин разводили в питьевой воде и давали в поилке в свободном доступе (опытная группа). 2 группа — мыши, которые содержались в условиях вивария с 10 месячного возраста в течение 8 мес. без фукоксантина (контрольная группа). Оценка когнитивного статуса осуществлялась при достижении мышами 18 мес. возраста с помощью тестов: «Крестообразный лабиринт», «Открытое поле с норками». Движения мышей фиксировали с помощью системы автоматической видеофиксации ANY-mazeVideoTrackingSystem, фиксированной над полем. У других 20 мышей (10 мышей получали фукоксантин, 10 — нет) в сыворотке крови методом ИФА определяли уровень цитокинов, ассоциированных со старением: ИЛ-6, TNF- α , MCP-1. С целью оценки антиоксидантной активности в гомогенате печени определяли уровень малонового диальдегида, в сыворотке крови — общей антиоксидантной активности.

В результате проведенного исследования получено увеличение средней продолжительности жизни у мышей, получавших фукоксантин. При оценке когнитивного статуса старых мышей, получавших фукоксантин,

выявлена более выраженная их двигательная, исследовательская активность по сравнению с мышами без фукоксантина. В сыворотке крови у этих мышей (опытная группа) снижен уровень цитокинов, ассоциированных со старением (ИЛ-6, TNF- α , MCP-1), в гомогенате печени повышена общая антиоксидантная активность, снижено содержание малонового диальдегида. Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют об геропротекторных свойствах фукоксантина, механизмы которых требуют дополнительного изучения.

Список литературы

1. Lashmanova E., Proshkina E., Zhikrivetskaya S., et al. Fucoxanthin increases lifespan of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* // *Pharmacol Res.* 2015. Vol. 100. P. 228–241. doi: 10.1016/j.phrs.2015.08.009
2. Sayuti N.H., Muhammad Nawawi K.N., Goon J.A., et al. A review of the effects of fucoxanthin on NAFLD // *Nutrients.* 2023. Vol. 15, N 8. P. 1954. doi: 10.3390/nu15081954

Максимова А.А. ✉, Шевела Е.Я., Ращупкин И.М., Тихонова М.А., Останин А.А., Черных Е.Р.

Эффекты кондиционных сред макрофагов человека на дифференцировку и дедифференцировку легочных фибробластов

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

✉ parkinson.dses@gmail.com

Аннотация. В настоящий момент активно ведется поиск клеток с антифиброгенным потенциалом. Здесь мы показываем, что кондиционная среда макрофагов может ингибировать TGF- β -индуцированную дифференцировку фибробластов легких, снижая экспрессию миофибробластных маркеров, и регулировать их дедифференцировку.

Ключевые слова: макрофаги человека; фибробласты; миофибробласты; дифференцировка; α -гладкомышечный актин; фиброз легких.

Maksimova A.A., Shevela E.Ya., Rashchupkin I.M., Tikhnova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

Effects of conditioned media of human macrophages on lung fibroblast differentiation and dedifferentiation

Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”, Novosibirsk, Russia

Abstract. Nowadays, there is a continuous search for cells with antifibrogenic potential. Here we show that macrophage conditioned media can inhibit TGF- β -induced lung fibroblast differentiation, reducing myofibroblast marker expression, and regulate fibroblast dedifferentiation.

Keywords: human macrophage; fibroblast; myofibroblast; differentiation; α -smooth muscle actin; pulmonary fibrosis.

Легочный фиброз — патологическое состояние, сопровождающееся нарушением нормальной структуры ткани и развитием дыхательной недостаточности. Лечение данной патологии представляет собой актуальную проблему, и в настоящий момент ведется активный поиск терапии, которая позволила бы остановить развитие фиброза и способствовала восстановлению функциональной легочной ткани. Один из перспективных подходов связан с использованием антифиброгенных макрофагов [1]. Однако в настоящий момент неясно, какие макрофаги из огромного спектра представленных фенотипов обладают способностью ингибировать развитие фиброза. Данная работа была направлена на определение возможных антифиброгенных свойств макрофагов человека — неполяризованных и поляризованных дексаметазоном, поскольку имеются единичные сообщения об антифиброгенной активности данных подтипов.

Макрофаги генерировали из моноцитов крови в течение 7 дней в присутствии M-CSF или GM-CSF. На 5 день с целью поляризации в культуры вносили 50 нг/мл дексаметазона (Dex), или оставляли клетки неполяризованными (M0). Таким образом, получали четыре популяции макрофагов, которые были обозначены как M-M0, GM-M0, M-M(Dex) и GM-M(Dex). Супернатанты данных культур (кондиционные среды) собирали и использовали в дальнейших исследованиях.

Фибробласты легких (клеточная линия HLF210) культивировали в течение 5 дней в стандартной среде DMEM/F12 (контроль) или в кондиционной среде макрофагов, в которые вносили 20 нг/мл TGF- β с целью индукции дифференцировки фибробластов в миофибробласты. Затем с помощью проточной цитометрии

в культурах (мио)фибробластов определяли уровень экспрессии α -гладкомышечного актина (α -SMA), основного миофибробластного маркера.

Кроме того, исследовали влияние кондиционных сред макрофагов на дифференцированные миофибробласты. С этой целью культуры фибробластов легких дифференцировали в течение 5 суток в присутствии 20 нг/мл TGF- β , что приводило к увеличению доли α -SMA-экспрессирующих клеток с 20% до 80%. Далее, среду, в которой культивировали фибробласты, замещали на кондиционные среды макрофагов или стандартную среду DMEM/F12 (контроль). Экспрессию α -SMA оценивали на 5 день с помощью проточной цитометрии. Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью ПО Statistica 8.0, различия между группами оценивали с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок; критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали $p = 0,05$.

Культивирование фибробластов легких в присутствии TGF- β (позитивный контроль) сопровождалось значительным увеличением количества α -SMA⁺ клеток (77,5% vs 18,5%, $pW = 0,02$), свидетельствуя о дифференцировке фибробластов в миофибробласты. Среди всех исследованных подтипов макрофагов, только секреторные продукты M-CSF-дифференцированных неполяризованных макрофагов оказывали ингибирующий эффект на дифференцировку легочных фибробластов, о чем свидетельствовало снижение доли α -SMA⁺ клеток до 38,8% ($pW = 0,04$). В то же время кондиционные среды поляризованных дексаметазоном M-CSF-макрофагов, а также неполяризованных и поляризованных GM-CSF-макрофагов не влияли на содержание α -SMA⁺, уровень которых не отличался значимо от контрольных культур (76%, 66,5% и 73%, соответственно, $pW > 0,05$ по сравнению с позитивным контролем).

Далее мы оценили влияние кондиционных сред макрофагов на дедифференцировку фибробластов. Оказалось, что в контрольных культурах клетки подвергаются спонтанной дедифференцировке, и на 5 день культивирования дифференцированных миофибробластов в среде без TGF- β количество α -SMA⁺ снижается до 18,5%. Аналогичную картину мы наблюдали в культурах, обработанных кондиционной средой M-M0 (15,5% α -SMA⁺ клеток, нет значимых различий с контрольными культурами, $pW = 0,38$). Содержание α -SMA⁺ клеток снижалось также и в присутствии кондиционной среды GM-M0 (29,5%), однако этот уровень превышал контрольные значения (на уровне тренда, $pW = 0,07$). Напротив, макрофаги, поляризованные дексаметазоном, поддерживали фибробласты в активированном состоянии (44% и 57,5% в кондиционной среде M-M(Dex) и GM-M(Dex) соответственно).

Макрофаги активно исследуются в качестве антифиброгенной терапии фиброза почек, печени, заболеваний сердца (пока преимущественно в экспериментах *in vivo*) [2–4]. Существуют также попытки терапии фиброзирующих заболеваний легких с помощью альвеолярных макрофагов [5]. Здесь мы демонстрируем, что а) кондиционные среды макрофагов могут регулировать процесс дифференцировки и дедифференцировки фибробластов легких, и б) M-CSF-дифференцированные макрофаги обладают антифиброгенным потенциалом в отношении фибробластов легких, поскольку, в отличие от других исследуемых подтипов, не поддерживают активированное состояние фибробластов и способны ингибировать их TGF- β -зависимую дифференцировку.

Авторы выражают благодарность Институту регенеративной медицины МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова за предоставление клеточной линии легочных фибробластов. Исследование выполнено при поддержке РФФИ (грант № 23-25-00349).

Список литературы

1. Na Y.R., Kim S.W., Seok S.H. A new era of macrophage-based cell therapy // *Exp Mol Med*. 2023. Vol. 55, N 9. P. 1945–1954. doi: 10.1038/s12276-023-01068-z
2. Byrne A.J., Maher T.M., Lloyd C.M. Pulmonary macrophages: a new therapeutic pathway in fibrosing lung disease? // *Trends Mol Med*. 2016. Vol. 22, N 4. P. 303–316. doi: 10.1016/j.molmed.2016.02.004
3. Ping D., Peng Y., Hu X., et al. Macrophage cytotherapy on liver cirrhosis // *Front Pharmacol*. 2023. Vol. 14. doi: 10.3389/fphar.2023.1265935
4. Sansonetti M., Al Soodi B., Thum T., et al. Macrophage-based therapeutic approaches for cardiovascular diseases // *Basic Res Cardiol*. 2024. Vol. 119, N 1. P. 1–33. doi: 10.1007/s00395-023-01027-9
5. Torrico S., Hotter G., Játiva S. Development of cell therapies for renal disease and regenerative medicine // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 24. doi: 10.3390/ijms232415943

Малахова А.А.¹✉, Макеева В.С.¹, Капитошина Е.В.¹, Аллаярова Э.Р.^{1,2}, Дырхеева Н.С.^{1,3}, Григорьева Е.В.¹, Медведев С.П.¹, Лаврик О.И.³, Закиян С.М.^{1,3}

Клеточные модели нейродегенеративных заболеваний для изучения патологических процессов в нейронах при протеинопатиях

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ amal@bionet.nsc.ru

Аннотация. Создание клеточных моделей на основе пациентспецифичных ИПСК с экспрессией биосенсоров стресса ЭПР, окислительного стресса и партанатоса позволяют изучать молекулярные механизмы патогенеза и приблизиться к разработке подходов к терапии нейродегенеративных заболеваний, вызванных протеинопатиями.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; генетически кодируемые биосенсоры; болезнь Гентингтона; болезнь Паркинсона; PARP1; клеточные модели.

Malakhova A.A.¹, Makeeva V.S.¹, Kapitoshina E.V.¹, Allayarova E.R.^{1,2}, Dyrkheeva N.S.^{1,3}, Grigoreva E.V.¹, Medvedev S.P.¹, Lavrik O.I.³, Zakian S.M.^{1,3}

Cell models of proteinopathy-associated neurodegenerative diseases for the study of pathological processes in neurons

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. The creation of cell models based on patient-specific iPSCs expressing biosensors of ER stress, oxidative stress and parthanatos allows the study of the molecular mechanisms of pathogenesis and the development of therapeutic approaches for neurodegenerative diseases caused by proteinopathy.

Keywords: induced pluripotent stem cells; genetically encoded biosensors; Huntington's disease; Parkinson's disease; PARP1; cell models.

Протеинопатия — наиболее частая причина развития нейродегенеративных заболеваний. Накопление в нейронах aberrantных форм белков — синуклеина при болезни Паркинсона, амилоида при болезни Альцгеймера, хантингтина при болезни Гентингтона и др., — приводит к нарушению белкового гомеостаза, дисфункции митохондрий и лизосом, и в конечном итоге ведет к клеточной гибели. В качестве моделей для изучения протеинопатий нами получены линии ИПСК пациентов с болезнями Гентингтона и Паркинсона с подтвержденной наследственной обусловленностью заболеваний (патогенные варианты генов HTT, GBA1, LRRK2). Кроме того, с использованием технологии CRISPR/Cas9 созданы линии ИПСК, несущие трансгены белков, склонных к агрегации (HTT с удлиненным полиглутаминовым трактом, SNCA). Клеточные модели

на основе ИПСК представляют собой незаменимый инструмент для биомедицинских исследований благодаря их способности дифференцироваться в различные типы клеток организма человека. Возможность прижизненной визуализации биохимических процессов, протекающих в клетке, реализована с помощью системы генетически кодируемых биосенсоров. Для удобства прижизненной визуализации клеточных процессов, происходящих в нейронах, дифференцированных из ИПСК, нами были созданы трансгенные клеточные линии, экспрессирующие генетически кодируемые биосенсоры окислительного стресса (GRX1-roGFP2) и стресса эндоплазматического ретикулума (XBP1-TagRFP). Применение генетически кодируемых биосенсоров даёт широкие возможности для создания клеточной платформы, позволяющей проводить комплексные исследования влияния экспрессии патологических вариантов белков на биохимические процессы, протекающие в дифференцированных клетках, а также для тестирования потенциальных лекарственных препаратов. Одной из потенциальных мишеней для воздействия лекарственных препаратов при нейродегенеративных заболеваниях является фермент PARP1. Гиперактивация PARP1 вследствие активного повреждения ДНК в нейронах, вызванного повышенным окислительным стрессом, приводит к избыточному синтезу поли-(АДФ-рибозы). В ответ на накопление поли-(АДФ-рибозы) в цитоплазме клетки, белок AIF (апоптоз-индуцирующий фактор) перемещается из митохондрий в ядро и запускает процесс клеточной гибели, называемой «партанатос». В исследованиях на модельных животных показано, что препараты-ингибиторы PARP1 оказывают нейропротекторное действие и способствуют замедлению развития симптомов нейродегенеративных заболеваний. Мы провели оценку активности фермента PARP1 в нейронах, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона и болезнью Паркинсона. Иммунофлуоресцентное окрашивание на поли-(АДФ-рибозу) показало повышенное содержание данного продукта активности PARP1 в нейрональных культурах пациентов с болезнью Гентингтона по сравнению с контрольными образцами. В то же время, *in vitro* оценка активности PARP в белковых экстрактах нейрональных культур не показала значимых различий между образцами пациентов и здоровых доноров. Вероятно, активность данного фермента регулируется на уровне посттрансляционных модификаций. Проведена оценка влияния ингибиторов PARP1 на активность генов, ассоциированных с развитием патологических изменений в мозге человека при болезни Гентингтона. Показано, что в культурах нейрональных клеток, дифференцированных из ИПСК пациентов с болезнью Гентингтона, обработка ингибитором PARP1 нирапарибом приводит к изменению профиля экспрессии генов PDE10a, RB1, TRKB, SORCIN, CREBBP, PARGC1. Для исследования механизмов гибели нейронов и поиска веществ, обладающих нейропротекторной активностью, нами создан генетически кодируемый репортер процесса партанатоса. Для визуализации партанатоса в живых клетках мы сконструировали флуоресцентный репортер, представляющий из себя химерный белок AIF, слитый с флуоресцентным белком TagGFP. Было создано несколько вариантов генетических конструкций, экспрессирующих репортеры, в которых TagGFP расположен либо на N-конце химерного белка, либо на C-конце, либо замещает один из функциональных доменов белка AIF. Перемещение флуоресцентного сигнала репортера из митохондрий в ядро клетки свидетельствует о запуске процесса партанатоса. Таким образом, полученные нами клеточные модели нейродегенеративных заболеваний человека позволяют решать широкий спектр задач в биомедицинских исследованиях, нацеленных на понимание механизмов нейродегенерации и разработку новых лекарственных препаратов.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 23-15-00224.

Малыгина А.В. ✉, Михайлова Н.А., Красковская Н.А.

Создание лентивирусной конструкции для получения индуцированных дофаминергических нейронов методом прямого репрограммирования

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ arina180902@mail.ru

Аннотация. Болезнь Паркинсона (БП) в настоящее время является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием, отягощающим около 10 миллионов пожилых людей во всем мире. БП характеризуется дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Несмотря на высокую распространенность, БП все еще является неизлечимой. Не существует эффективных инструментов для предотвращения возникновения БП, выявления заболевания на ранних стадиях или точной оценки риска прогрессирования заболевания. Следовательно, существует растущий спрос на пациент-специфические модели БП в виду гетерогенности и возраст-ассоциированности данной нейропатологии. Метод прямого репрограммирования позволяет получить модель нейронов, сохраняя возрастные изменения клеток. Молекулярной основой прямого репрограммирования являются специфические для линии транскрипционные факторы. В ходе анализа литературных данных, было выяснено, что *Nurr1* играет решающую роль в развитии и созревании дофаминергических нейронов среднего мозга.

В представленной работе мы получили лентивирусную конструкцию, содержащую ген *Nurr1*, которую затем использовали для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в индуцированные дофаминергические нейроны методом прямого репрограммирования.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; дофаминергические нейроны; лентивирусные конструкции; прямое репрограммирование; транскрипционные факторы.

Malygina A.V., Mikhailova N.A., Kraskovskaya N.A.

Development of a lentiviral construct for production of induced dopaminergic neurons by direct reprogramming

Institute of Cytology of RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Parkinson's disease (PD) is currently the second most common neurodegenerative disease, affecting about 10 million elderly people worldwide. PD is characterized by degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra of the midbrain. Despite its high prevalence, PD is still incurable. There are no effective tools to prevent the occurrence of PD, detect the disease at an early stage, or accurately assess the risk of disease progression. Consequently, there is a growing demand for patient-specific models of PD due to the heterogeneity and age-associated nature of this neuropathology. The direct reprogramming method allows us to obtain a model of neurons, preserving the age-related changes in cells. The molecular basis of direct reprogramming is line-specific transcription factors. During the analysis of the literature data, it was found that *Nurr1* plays a crucial role in the development and maturation of dopaminergic neurons of the midbrain.

In the present work, we obtained a lentiviral construct containing the *Nurr1* gene, which was then used to differentiate mesenchymal stem cells into induced dopaminergic neurons by direct reprogramming.

Keywords: Parkinson's disease; dopaminergic neurons; lentiviral constructs; direct reprogramming; transcription factors.

Болезнь Паркинсона является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием и преимущественно характеризуется потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Несмотря на высокую распространенность все еще не существует эффективных способов предотвращения возникновения БП, выявления заболевания на ранних стадиях или точной оценки риска прогрессирования заболевания. Это обуславливает высокий спрос на получение модели дофаминергических нейронов, которую можно использовать для изучения патогенеза БП и тестирования лекарственных средств [1].

Особый интерес вызывают модели дофаминергических нейронов на основе клеток человека. Чтобы сохранить возрастные изменения, наблюдающиеся при НДЗ наиболее подходящим представляется использовать метод прямого репрограммирования клеток.

Прямое репрограммирование — это метод преобразования судьбы клетки без перехода через промежуточное плюрипотентное состояние, в ходе которого клетки одной линии преобразуются из одного типа в другой. Молекулярной основой прямого репрограммирования являются специфичные для типов нейронов транскрипционные факторы [2]. NURR1 (белок, связанный с ядерным рецептором 1) играет решающую роль в развитии и созревании дофаминергических нейронов среднего мозга [3]. Специальные среды для дифференцировки в сочетании с микроРНК, малыми молекулами и нейротрофическими факторами позволяют получать определенные типы нейрональных клеток человека.

Поэтому целью нашей работы стало получение популяции индуцированных дофаминергических нейронов из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) путем прямого репрограммирования с применением специфичных для типа нейронов транскрипционных факторов.

В ходе изучения литературных данных подобран вектор N174-MCS, который содержит промотор EF α , обеспечивающий стабильную экспрессию в процессе дифференцировки, и селективный маркер — ген устойчивости к антибиотику млекопитающих G148, а также уникальный сайт клонирования — MCS.

Составлены праймеры для ПЦР амплификации продуктов гена *Nurr1*.

Методом молекулярного клонирования получена лентивирусная конструкция, содержащая ген *Nurr1*.

Проведен иммунофлюоресцентный анализ с использованием антител к flag-тагу. При составлении праймеров к гену *Nurr1* в последовательность была добавлена метка, соответствующая последовательности пептида Flag, так что при экспрессии гена должен образовываться не только белок *Nurr1*, но и пептид Flag. На микрофотографиях можно видеть, что МСК, в которые была доставлена лентивирусная конструкция, демонстрируют наличие пептида Flag в области ядра, в то время как его присутствие в ядрах контрольных клеток не наблюдается. Следовательно, проведенный сравнительный анализ контрольных клеток и клеток, трансдуцированных лентивирусной конструкцией, подтверждает образование белка в следствие экспрессии гена *Nurr1*.

Запущена дифференцировка МСК в индуцированные нейроны методом прямого репрограммирования с использованием полученной лентивирусной конструкции. На 14 день после запуска дифференцировки у клеток наблюдаются изменения морфологии с фибробластоподобной на нейроноподобную, что характеризуется образованием длинных отростков.

Иммунофлюоресцентный анализ с использованием антител к MAP2 — маркеру взрослых нейронов, и TH — маркеру дофаминергических нейронов, демонстрирует наличие этих белков в клетках на 14 день после запуска дифференцировки. Однако наличие TH в клетках несколько меньше, чем MAP2. В МСК, трансдуцированных лентивирусной конструкцией, содержащей ген *Nurr1*, и в контрольной группе МСК наличие нейрональных маркеров не наблюдается. Таким образом, проведенный сравнительный анализ ряда клеток до и после запуска дифференцировки методом прямого репрограммирования показывает, что МСК вступают в дифференцировку и к 14 дню демонстрируют фенотип взрослых нейронов, однако недостаточное образование TH свидетельствует о том, что этого времени не достаточно для полной специализации нейронов.

В заключение хотелось бы сказать, что выполненная работа представляет собой только 1 этап по созданию нового протокола репрограммирования, далее мы будем модифицировать его, чтобы получить высокоэффективный протокол для получения популяции индуцированных дофаминергических нейронов, которые могут быть использованы в дальнейших исследованиях патогенеза БП. В дальнейшей работе планируется

определить насколько эффективно применение полученной лентивирусной конструкции при увеличении продолжительности репрограммирования и при использовании дермальных фибробластов от взрослых доноров в качестве «стартовых» клеток.

Список литературы

1. Addis R.C., Hsu F.C., Wright R.L., et al. Efficient conversion of astrocytes to functional midbrain dopaminergic neurons using a single polycistronic vector // PLoS ONE. 2011. Vol. 6, N 12. ID e28719. doi: 10.1371/journal.pone.0028719
2. Kraskovskaya N., Bolshakova A., Khotin M., et al. Protocol optimization for direct reprogramming of primary human fibroblast into induced striatal neurons // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, N 7. ID 6799. doi: 10.3390/ijms24076799
3. García-Yagüe Á.J., Cuadrado A. Mechanisms of NURR1 regulation: consequences for its biological activity and involvement in pathology // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, N 15. ID 12280. doi: 10.3390/ijms241512280

Мальцев С.А. ✉, Петракова Н.В., Зобкова Ю.О., Баранов О.В., Фомин А.С., Ашмарин А.А., Комлев В.С.

Кальций-фосфатный материал для замещения костных дефектов с возможностью люминесцентной диагностики

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

✉ sergmaltsev97@mail.ru

Аннотация. Работа направлена на получение порошков трикальцийфосфата, допированных ионами Er и Yb, и изучение фазового состава и люминесцентных свойств в видимой и ИК-областях спектра полученных материалов.

Ключевые слова: трикальцийфосфат; эрбий; иттербий; люминесцентные свойства; биоматериалы.

Maltsev S.A., Petrakova N.V., Zobkova Yu.O., Baranov O.V., Fomin A.S., Ashmarin A.A., Komlev V.S.

Calcium phosphate material for the replacement of bone defects with the possibility of luminescent diagnosis

A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The work is aimed at obtaining tricalcium phosphate powders doped with Er and Yb ions, and studying the phase composition and luminescent properties in the visible and IR spectral regions of the obtained materials.

Keywords: tricalcium phosphate; erbium; ytterbium; luminescent properties; biomaterials.

На данном этапе развития современной регенеративной медицины особое внимание уделяется разработке эффективных методов диагностики и контроля процессов репарации костных дефектов. Наиболее перспективными являются неинвазивные методы (рентгенологические, радионуклидные, ультразвуковые, компьютерная и ядерно-магнитно-резонансная томографии), не предполагающие нарушение целостности тканей организма. Тем не менее, эти методы имеют недостатки, такие как использование токсичных контрастных веществ и деструктивных рентгеновского и ультрафиолетового (УФ) излучений, а также низкую информативность и высокую стоимость оборудования. Преодолеть данные ограничения возможно при помощи биоматериала, способного одновременно выполнять функции имплантата и контрастного вещества, люминесцирующего в безопасном для человека ИК-диапазоне. В качестве матрицы был выбран трикальцийфосфат ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), обладающий высоким уровнем биосовместимости и биоактивности [1]. Генерация излучения возможна благодаря внедрению в структуру имплантата таких редкоземельных ионов, как эрбий (Er) и иттербий (Yb). Высокая вариативность длин волн, способность излучать в безопасном для человека ИК-диапазоне, обладающем высокой проникающей способностью, делает данные элементы перспективными легирующими добавками при создании люминесцирующего биоматериала [2].

Целью работы являлось получение и исследование порошков ТКФ, допированных Er и Yb, испускающие излучение в видимой и ИК-областях спектра. Синтез ТКФ проводили методом осаждения из растворов. В качестве исходных компонентов были использованы растворы нитратов металлов и гидрофосфата аммония. Значение pH поддерживали на уровне 7. Полученный осадок отфильтровывали и высушивали в сушильном шкафу, после чего прокаливали в печи при температуре 1000°C для получения хорошо закристаллизованной фазы β -ТКФ и при температуре 1300°C для осуществления фазового перехода β -ТКФ в α -ТКФ (где β -ромбоэдрическая модификация ТКФ, α -моноклинная).

По данным рентгенофазового анализа (РФА) и ИК-спектроскопии установлено, что порошки являются преимущественно однофазными, с долей гидроксиапатита (до 10 масс. %). Методом фотолюминесцентной спектроскопии получены спектры для ТКФ: Er_x, Yb_y (x, y = 1–25%).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-63-10056, <https://rscf.ru/project/23-63-10056/>

Список литературы

1. Chen F., Huang P., Zhu Y.J. Multifunctional $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ dual doped calcium phosphate vesicle like nanospheres for sustained drug release and imaging // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, N 27. P. 6447–6455. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.059
2. Грузинцев А.Н., Бартоу К., Беналул П. Люминесцентные свойства светодиодов на основе арсенида галлия с антистоксовым люминофором $\text{Y}_2\text{O}_3\text{:Er,Yb}$ // *Физика и техника полупроводников*. 2008. Т. 42, № 3. С. 365–369. EDN: RCPTHJ

Мамедова А.Р.^{1,2} ✉, Смольянинова Л.В.^{1,2}, Копейна Г.С.^{1,2}, Скрыбин Б.В.³, Аверина О.А.^{4,5},
Попов В.С.^{2,6}, Пермяков О.А.⁵, Животовский Б.Д.^{1,2,7}

Физиологические и молекулярные эффекты инактивации каспазы-2 у млекопитающих

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

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

³ Университет Мюнстера, Германия

⁴ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт функциональной геномики, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ Институт регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁷ Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ mamedova.aygun.99@mail.ru

Аннотация. Работа посвящена изучению функций белка каспазы-2 у Casp2^{-/-} мышей линии FVB, которые проявили неожиданный фенотип в виде инфертильности гомозиготных нокаутных самок. Это первое исследование в мире, описывающее потерю репродуктивной функции при инактивации белка семейства каспаз.

Ключевые слова: каспаза-2; бесплодие; нокаут; мыши FVB; CRISPR/Cas9.

Mamedova A.R.^{1,2}, Smolyaninova L.V.^{1,2}, Kopeina G.S.^{1,2}, Skryabin B.V.³, Averina O.A.^{4,5}, Popov V.S.^{2,6},
Permyakov O.A.⁵, Zhivotovsky B.D.^{1,2,7}

The physiological and molecular effects of caspase-2 inactivation in mammals

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ University of Münster, Germany

⁴ Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁷ Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract. The study focuses on investigation of caspase-2 functions in Casp2^{-/-} FVB mice, which exhibited unexpected phenotype characterized by infertility in homozygous knockout females. This is the first research to describe the loss of reproductive capacity during inactivation of caspase family proteins.

Keywords: caspase-2; infertility; knockout; FVB mice; CRISPR/Cas9.

Апоптоз — наиболее изученный тип программируемой гибели клеток в многоклеточных организмах, представляющий собой генетически регулируемый процесс удаления выполнивших свою функцию нежелательных клеток в организме и осуществляющий гомеостатическое поддержание клеточной популяции в тканях. Этот процесс во многом зависит от активации каспаз — семейства цистеин-аспарагиновых протеаз, которые содержат в активном центре цистеин и способны, как и гранзим Б, специфически распознавать и расщеплять белковые субстраты после аспарагиновой кислоты. Каспазы известны преимущественно участием в апоптозе и играют важную роль в инициации и регуляции апоптотической гибели клеток. Однако все чаще у данных белков обнаруживаются новые функции, не связанные с клеточной

гибелью. Например, члены этого семейства регулируют воспалительные реакции и участвуют в процессах пролиферации и дифференцировки.

Несмотря на свой номер, каспаза-2 была первой из обнаруженных у человека каспаз, однако, к сожалению, до сих пор остается наименее изученной. Каспаза-2 — это уникальный белок среди всех членов семейства цистеиновых протеаз, который характеризуется свойствами как инициаторных (схожая структурно-доменная организация и активация), так и эффекторных (схожая специфика расщепления субстратов) каспаз. Этот белок принимает участие как в апоптотических, так и в неапоптотических процессах, а точные механизмы активации, молекулярные аспекты и физиологические функции этой протеазы до сих пор остаются предметом многочисленных дискуссий и требуют более глубокого изучения. В связи с этим целью данной работы стало исследование молекулярных и физиологических эффектов инактивации каспазы-2 у млекопитающих.

Для достижения поставленной цели и исследования роли и функций каспазы-2 был осуществлен конститутивный нокаут этого гена у мышей линии FVB с помощью технологии CRISPR/Cas9, которая ранее не применялась для нокаута каспазы-2 в модели *in vivo*. Были внесены делеции длиной 7 (d7/d7) или 20 (d20/d20) нуклеотидов в 5-ом экзоне, перед последовательностью активного центра фермента, что приводило к сдвигу рамки считывания и формированию преждевременного стоп-кодона. Вследствие этого, инактивация каспазы-2 в данном случае осуществляется сразу на трех уровнях: 1) процесс трансляции не доходит до активного центра; 2) молекула РНК, которая не прошла полный процесс трансляции, разрушается с помощью механизма нонсенс-опосредованной дегградации, направленного на выявление и разрушение матричных РНК, содержащих преждевременные стоп-кодона и другие дефекты; 3) в редких случаях, когда рибосоме удается продолжить трансляцию после стоп-кодона формируется полипептидная цепь, которая не будет иметь функционального смысла и, вероятно, подвергнется процессу дегградации в протеасоме.

Получение нокаутных по каспазе-2 мышей происходило путем подсаживания генетически модифицированных зигот линии FVB в матку самкам-реципиентам, которые предварительно спаривались с вазектомизированными самцами и находились в состоянии псевдобеременности. Путем дальнейших скрещиваний полученного потомства между собой осуществлялось ведение и поддержание нокаутных мышей.

Для подтверждения полноценной инактивации каспазы-2 были проанализированы особенности её экспрессии на уровне РНК и белка в различных тканях нокаутных животных (в частности, в тканях легких, головного мозга, яичника и матки) с помощью количественной ПЦР (ОТ-кПЦР) и методом вестерн-блоттинга, соответственно. Результаты ОТ-кПЦР подтвердили нокаут каспазы-2 на уровне транскрипции. Было также продемонстрировано, что транскрипты, кодирующие варианты каспазы-2 с делециями, активно деградируют за счет функционирования системы нонсенс-опосредованного распада, что выражается в снижении общего уровня экспрессии каспазы-2 на 80–90% в группе d20/d20 и на 50–60% в группе d7/d7. Метод вестерн-блоттинга, в свою очередь, подтвердил отсутствие белка каспазы-2 в образцах нокаутной группы.

Общая характеристика мышей с дефицитом каспазы-2 показала, что нокаутные мыши не имели ярко выраженных патологий, в т.ч. соблюдалось строгое расщепление потомства по Менделю при скрещивании гетерозиготных особей; отсутствовали различия по результатам патоморфологического анализа нокаутных самок и самцов, а также нарушения в функционировании половой системы самцов. Однако совершенно неожиданным эффектом стало бесплодие самок с гомозиготным нокаутом каспазы-2. По результатам анализа литературы выяснилось, что ранее такая выраженная связь каспазы-2 с репродуктивной функцией не была описана ни в одной из опубликованных работ. Детальное исследование мышей с таким необычным фенотипом может дать ценную информацию о том, какие регуляторные механизмы, помимо апоптоза, могут критически зависеть от активности каспазы-2, и позволит в конечном итоге добиться лучшего понимания функций каспазы-2 в репродуктивных тканях, регуляции работы женской половой системы, механизмов развития женского бесплодия и возможных способов борьбы с ним.

Работы выполнены при поддержке гранта РФ № 23-74-30006.

Манжуло И.В., Манжуло О.С., Пономаренко А.И. ✉

Синаптамид регулирует реактивный астроглиоз при черепно-мозговой травме у мышей

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского» Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ arina.ponomarenko.93@mail.ru

Аннотация. Данное исследование направлено на изучение молекулярных и клеточных механизмов, благодаря которым синаптамид тормозит реактивный астроглиоз в коре и таламусе через 7 дней после черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у мышей.

Ключевые слова: синаптамид (N-докозагексаэноилэтанолламин); черепно-мозговая травма; реактивный астроглиоз; виментин.

Manzhulo I.V., Manzhulo O.S., Ponomarenko A.I.

Synaptamide regulates reactive astrogliosis in mice with traumatic brain injury

A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract. This study aims to investigate the molecular and cellular mechanisms by which synaptamide inhibits reactive astrogliosis in the cortex and thalamus 7 days after traumatic brain injury (TBI) in mice.

Keywords: synaptamide (N-docosahexaenylethanolamine); traumatic brain injury; reactive astrogliosis; vimentin.

Возникновение вторичной травмы, развивающейся после непосредственно самой ЧМТ, во многом зависит от тяжести и локализации первичного повреждения и может привести к инвалидности или смерти [1]. Механизм активации астроцитов в ответ на повреждение, называемый «реактивным астроглиозом», позволяет быстро адаптировать функционирование астроглии для минимизации повреждения и защиты нейронов от вторичного повреждения [2]. Однако процессы, торможения активации астроглии, зачастую бывают не столь эффективными, или своевременными. Порочный круг реактивирующей друг друга астро- и микроглии вызывает дополнительное повреждение клеток мозга за счет избыточной продукции цитокинов, свободных радикалов и эксайтоксичных нейромедиаторов, что приводит не к локализации и уменьшению очага повреждения, а напротив к вовлечению дополнительных участков и отделов головного мозга.

В связи с чем, все большую популярность набирают исследования, посвященные поиску новых мишеней и соединений для управляемого контроля активации глии и развития нейровоспаления в раннем и позднем посттравматических периодах. За последнее десятилетие синаптамид стал известен как член семейства N-ациламинов с уникальными свойствами, направленными на подавление активации глии и процессов нейровоспаления [3].

Настоящее исследование проводилось на 3-месячных самцах мышей линии C57BL/6. Черепно-мозговую травму формировали с помощью падения груза массой 20 г с высоты 10 см непосредственно на кору головного мозга животного через краниальное окно. Синаптамид вводили подкожно в холку в дозе 10 мг/кг в объёме 100 мкл, ежедневно в течение 7 дней со дня операции. Исследование было сосредоточено на 2 целевых областях: ипсилатеральные кора и таламус, расположенные непосредственно под местом повреждения. Изучались такие параметры как: распределение GFAP- и виментин-иммунопозитивных астроцитов (иммуногистохимия), экспрессия мРНК (ПЦР) и синтез белков (вестерн-блоттинг) GFAP и виментина, экспрессия мРНК маркеров «A1» и «A2» активации астроцитов (C3, S100a10 и Clcf1) (ПЦР).

Также определяли уровень биомаркеров повреждения мозга в сыворотке крови (GFAP, S100 и MBP) методом вестерн-блоттинг.

GFAP и виментин являются астроглиальными белками из группы промежуточных филаментов. В связи с усилением пролиферации, миграции и синтетических функций астроцитов после ЧМТ синтез GFAP и виментина также усиливался. Терапия синаптамидом на 7 сутки после ЧМТ тормозила развитие реактивного астроглиоза, приводя к уменьшению GFAP- и виментин-иммунопозитивных областей, а также торможению экспрессии мРНК и синтеза данных белков в таламусе и коре головного мозга.

На сегодняшний день известно, что реактивные астроциты. Подобно клеткам микроглии, подразделяются на два отдельных подтипа «А1» (нейротоксический) и «А2» (нейропротекторный) на основе их соответствующих профилей транскрипции [4]. Анализируя гены транскриптома реактивных астроцитов, было установлено, что СЗ является наиболее часто используемым специфическим маркером астроцитов А1, тогда как S100a10 и Clcf1 являются преимущественно маркерами астроцитов А2. После ЧМТ как в коре, так и в таламусе происходит резкое усиление экспрессии мРНК СЗ, в разы превышая контрольный уровень, тогда как уровень экспрессии Clcf1 напротив снижается в таламусе, но не в коре. Терапия синаптамидом смещает вектор активации астроглии в сторону нейропротекторного А2 типа, снижая экспрессию мРНК СЗ и усиливая экспрессию Clcf1, связываемого многочисленными исследованиями с выживаемостью нейронов после нейротравмы. Исследование уровня S100a10 в коре не дало достоверных результатов, однако в таламусе синаптамид вызывал активацию экспрессии мРНК S100a10 в группе с ЧМТ и лечением.

Биомаркеры сыворотки крови в последнее время широко изучаются и даже применяются в клинической практике как неинвазивные методы оценки тяжести повреждения у пациентов с ЧМТ. Данные настоящего исследования подтверждают терапевтическую эффективность синаптамида, как препарата, улучшающего исход после тяжелой ЧМТ у мышей. Терапия значительно тормозила индуцированное повреждением повышение уровня всех трех исследуемых глиальных белков (GFAP, S100 и MBP) в сыворотке крови.

Понимание механизмов регенерации мозга после повреждения и возможность корректировать эти процессы с помощью фармакологических препаратов является перспективным направлением нейробиологии и медицины. Исследуемый в данной работе синаптамид уже зарекомендовал себя, как мощное противовоспалительное, глиотропное и нейропротекторное соединение, которое является эндогенным для организма и не имеет токсических побочных эффектов, более детальное изучение молекулярных мишеней которого нуждается в дальнейшем изучении.

Список литературы

1. Rodriguez-Grande B., Obenaus A., Ichkova A., et al. Gliovascular changes precede white matter damage and long-term disorders in juvenile mild closed head injury // *Glia*. 2018. Vol. 66, N 8. P. 1663–1677. doi: 10.1002/glia.23336
2. Sofroniew M.V. Astrocyte reactivity: subtypes, states, and functions in CNS innate immunity // *Trends Immunol.* 2020. Vol. 41, N 9. P. 758–770. doi: 10.1016/j.it.2020.07.004
3. Park T., Chen H., Kevala K., et al. N-docosahexaenoylethanolamine ameliorates LPS-induced neuroinflammation via cAMP/PKA-dependent signaling // *J Neuroinflammation*. 2016. Vol. 13, N 1. P. 284. doi: 10.1186/s12974-016-0751-z
4. Liddelow S.A., Barres B.A. Reactive astrocytes: production, function, and therapeutic potential // *Immunity*. 2017. Vol. 46, N 6. P. 957–967. doi: 10.1016/j.immuni.2017.06.006

Марей М.В.¹✉, Манухова Л.А.¹, Высоких М.Ю.^{1,2}, Ребриков Д.В.¹, Скулачев М.В.²

Митохондриально-адресованное производное пластохинона attenuates гибель фибробластов пациентов с синдромом Лея в модели индуцированного окислительного стресса *in vitro*

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

✉ mariamarey@mail.ru

Аннотация. Воздействие производным пластохинона на фибробласты пациентов в клеточной модели синдрома приводит к восстановлению здорового клеточного фенотипа.

Ключевые слова: митохондрии; активные формы кислорода; SkQ1; синдром Лея.

Marey M.V.¹, Manukhova L.A.¹, Vysokikh M.Yu.^{1,2}, Rebrikov D.V.¹, Skulachev M.V.²

Mitochondria-targeted plastoquinone derivative attenuates the death of fibroblasts from patients with Leigh syndrome in an *in vitro* model of induced oxidative stress

¹ National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

² Research Institute of Physical and Chemical Biology named after A.N. Belozersky MSU, Moscow, Russia

Abstract. Exposure of patient fibroblasts to plastoquinone derivatives in a cellular model of the syndrome leads to restoration of a healthy cellular phenotype.

Keywords: mitochondria; reactive oxygen species; SkQ1; Leigh syndrome.

При нарушении кинетики переноса электрона в дыхательной цепи митохондрий, комплексы I и III становятся одними из основных источников активных форм кислорода (АФК) в клетках пациентов с синдромом Лея. Повышение уровня АФК связано с дисбалансом между скоростью образования свободных радикалов и их утилизации при помощи многоуровневой системы антиоксидантной защиты. Рост внутриклеточных АФК может привести к окислению ДНК, липидов и белков и, таким образом, повлиять на фундаментальные клеточные процессы. Целью данного исследования было изучение механизма влияния антиоксиданта направленного действия SkQ1 на нормализацию баланса продукции и утилизации АФК при внешней индукции внутриклеточного окислительного стресса в фибробластах пациентов с синдромом Лея с определенными мутациями в гене SURF1 и нарушенном переносе электрона в сукцинат-убихинонредуктазном участке дыхательной цепи. Было показано, что защитное действие производного пластохинона, адресованного в митохондрии, опосредовано не только снижением степени окисленности кардиолипина внутренней митохондриальной мембраны, но и последующей стабилизацией белкового комплекса, формирующего метаболический микрокомпартмент, состоящий из митохондриальных мембранных белков VDAC1, TSP0, ANT и периферических киназ НК2 и mtCK. Ранее было показано, что сохранение интактной структуры такого микрокомпартмента приводит к снижению продукции АФК по механизму мягкой деполяризации внутренней мембраны митохондрий. Характеристика биоэнергетических параметров и продукции АФК показала,

что клеточная модель синдрома Лея описывается повышенным внутриклеточным окислительным стрессом и окислительным повреждением ДНК и белков, а лечение фибробластов пациентов в предложенной модели терапевтического воздействия производным пластохинона в дополнение к снижению продукции ROS и внутриклеточного окислительного стресса привело к восстановлению здорового клеточного фенотипа.

Маркина Е.А. ✉, Бобылева П.И., Матвеева Д.К., Буравкова Л.Б.

Особенности процессов восстановления стромальных и гемопоэтических прогениторных клеток костномозговой ниши после воздействия ионизирующего излучения и токсических веществ

Государственный научный центр РФ — Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

✉ goncharova-tim@list.ru

Аннотация. Присутствие органических летучих соединений в концентрациях, не превышающих ПДК в пострadiационный период усугубляет негативное действие облучения на гемопоэтические предшественники костного мозга.

Ключевые слова: радиация; токсикология; костный мозг; ГСПК; стромальные предшественники.

Markina E.A., Bobyleva P.I., Matveeva D.K., Buravkova L.B.

The peculiarities of recovery processes of stromal and hematopoietic progenitor cells in the medullary niche after exposure to ionizing radiation and toxic substances

Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Organic volatile compounds present in concentrations not exceeding MAC during the post-radiation period undeniably exacerbate the adverse impact of irradiation on haemopoietic bone marrow precursors.

Keywords: radiation; toxicology; bone marrow; HSPCs; stromal precursors.

Известно, что во время космических полетов все системы организма подвергаются воздействию экстремальных факторов, таких как невесомость и ионизирующее излучение. Ещё одним негативным фактором космического полета являются летучие органические соединения (ЛОС) в атмосфере космического аппарата, которые могут вызывать токсические эффекты при длительном воздействии. Химический состав воздушной среды на международной космической станции (МКС) является многокомпонентным и представлен более 100 ЛОС: в основном спиртами, альдегидами, ароматическими углеводородами, фталатами и хлорорганическими соединениями [1]. Костный мозг является одним из ключевых органов кроветворения и поддержания иммунной системы, представляет собой сложную систему, состоящую из различных типов клеток с отличающихся по радиочувствительности свойствами. Наряду с радиочувствительными клетками (гемопоэтические предшественники разной степени коммитирования) в его состав входят радиорезистентные клетки: клетки эндоста, эндотелий, стромальные прогениторные клетки костного мозга. Клетки стромы костного мозга поддерживают функциональный гомеостаз гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в физиологических условиях и обеспечивают его восстановление при повреждении. Известно негативное влияние таких токсических агентов, как бензол, ацетон, этанол и ацетальдегид на гемопоэз [2, 3].

Целью работы было изучение характера адаптации прогениторных клеток костного мозга крыс в период 2-недельного восстановления после воздействия ионизирующего излучения и летучих органических соединений.

Исследования были проведены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar, массой 180–200 г. При моделировании радиационного воздействия крыс подвергали 10-кратному внешнему фракционированному

гамма-облучению в суммарной дозе 500 сГр в течение 30 суток. Затем после окончания облучения в течение 30 суток животные подвергались ингаляционному воздействию смеси химических веществ (ацетон, ацетальдегид, бензол). Состав и концентрации химических соединений для затравочной смеси определялись приоритетным перечнем химических веществ, определяющих уровень загрязнения воздушной среды химическими соединениями, которые вносят основной вклад (от 85 до 95%) в загрязнение воздушной среды пилотируемых космических аппаратов. Длительность восстановительного периода после воздействий составил 14 суток. Во время восстановления животные содержались в стандартных условиях вивария. Контрольная группа животных содержалась в стандартных условиях вивария. Последующий анализ восстановления пула прогениторных клеток после воздействия радиации и ЛОС был проведен на животных следующих групп: 1) Виварный контроль — «К», 2) Облучение — «О», 3) Восстановление после облучения — «ВО», 4) Восстановление после сочетанного радиационно-химического воздействия — «ВТО». После выделения клеток костного мозга, были определены клеточность, число колоний-образующих единиц: КОЕ-ф, число КОЕ-Г, КОЕ-ГМ, КОЕ-М, КОЕ-преВ, БОЕ-Э, адипо- и остеопотенциал стромальных предшественников, пролиферативная активность клеток первичной культуры костного мозга, а также измерена концентрация про- и противовоспалительных цитокинов и факторов роста и транскрипция генов, определяющих коммитирование стромальных предшественников, гомеостаз костной ткани и взаимодействия ГСПК с клетками костномозговой ниши.

В группах О и ТО наблюдалось уменьшение клеточности и пролиферативной активности, числа КОЕ-ф и гемопоэтических КОЕ, а также усиление адипогенеза стромальных прогениторных клеток на фоне противовоспалительного паракринного и прорезорбтивного транскрипционного профиля.

Облучение приводило к угнетению гемопоэтических предшественников миелоидного и лимфоидного ряда. Негативный эффект развивался в результате, как непосредственного воздействия ионизирующего излучения на гемопоэтические клетки (ГСПК), так и повреждения стромального компонента костномозговой ниши и процессов взаимодействия ГСПК со стромальными прогениторами костного мозга и эндоостальной выстилки. Присутствие в воздушной смеси ЛОС на уровне, не превышающем предельно-допустимых концентраций (ПДК) в пострадиационном периоде, привело к усилению негативных эффектов в ГСПК костного мозга, несмотря на частичное восстановление стромального компонента и межклеточного взаимодействия. 14-суточная реадаптация характеризовалась восстановлением функциональной активности стромальных клеток, при этом наблюдались негативные эффекты в популяциях гемопоэтических предшественников миелоидного и лимфоидного ряда. Выявленные изменения свидетельствуют о большей чувствительности ГСК к воздействию токсических соединений и необходимости анализа влияния ЛОС, присутствующих в атмосфере космических аппаратов в концентрациях, не превышающих ПДК, на систему кроветворения человека.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ ИМБП РАН проект № FMFR-2024-0032.

Список литературы

1. Григорьев Г.Ю., Лагутин А.С., Набиев Ш.Ш., и др. Мониторинг состава воздуха и воды при длительных и межпланетных космических полетах // Космические исследования. 2020. Т. 58, № 1. С. 16–26. EDN: WSXGAP doi: 10.31857/S0023420620010021
2. Snyder R. Overview of the toxicology of benzene // J Toxicol Environ Health A. 2000. Vol. 61, N 5–6. P. 339–346. doi: 10.1080/00984100050166334
3. Баранцева М.Ю., Мухамедиева Л.Н., Иванова С.М., и др. Фосфолипиды бислоя мембран эритроцитов при сочетанном воздействии ингаляции химических веществ и ионизирующего излучения // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2019. Т. 53, № 4. С. 80–87. EDN: PSLHDS doi: 10.47470/0016-9900-2021-100-3-290-294

Маркин А.М. ✉, Киселева Д.Г., Хованцева У.С., Чередниченко В.Р., Чакал Д.А.,
Брешенков Д.Г., Маркина Ю.В., Чарчян Э.Р.

Особенности функционирования клеточных популяций кровеносных сосудов как фундамент восстановления нормальной структуры ткани

Государственный научный центр Российской Федерации ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика
Б.В. Петровского», Москва, Россия

✉ alexander.markin.34@gmail.com

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания остаются основной причиной смерти людей в мире. Это очень гетерогенная группа болезней, включающая крайне разнообразные патологии. Однако многие из них несут в себе схожие изменения на клеточном уровне, проявляющиеся пластичностью фенотипа популяций клеток сосудов.

Ключевые слова: аневризма грудного отдела аорты; атеросклероз; гладкомышечные клетки; эндотелиальные клетки; трансэндотелиальный транспорт; транскриптом; секретом; протеом.

Markin A.M., Kiseleva D.G., Khovantseva U.S., Cherednichenko V.R., Chakal D.A., Breshenkov D.G.,
Markina Yu.V., Charchyan E.R.

Features of the functioning of vascular cell populations as the foundation for the restoration of normal tissue structure

Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. Cardiovascular diseases remain the leading cause of death worldwide. This is a very heterogeneous group of diseases, encompassing highly diverse pathologies. However, many of them share similar changes at the cellular level, characterized by the phenotypic plasticity of vascular cell populations.

Keywords: thoracic aortic aneurysm; atherosclerosis; smooth muscle cells; endothelial cells; transendothelial transport; transcriptome; secretome; proteome.

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) до сих пор остаются основной причиной смерти людей во всём мире. По оценкам ВОЗ, смертность от данных патологий достигает 17,9 млн человек в год [1]. Не последнее место в этой группе заболеваний занимают аневризма грудного отдела аорты (АГА) и идущие рука об руку ишемическая болезнь сердца (ИБС), хроническая сердечная недостаточность (ХСН) и атеросклероз (АЗ), которым отводится значительная доля в структуре коморбидной патологии при АГА. Так, при АГА ишемическая болезнь сердца встречается в 38,6% случаев, хроническая сердечная недостаточность — в 27,6%, а АЗ аорты, коронарных и сонных артерий — с частотой 12,9%, 16,6% и 5,5% соответственно [2]. Являясь по своей сути крайне различными заболеваниями, АГА и АЗ (и его производные) имеют схожие черты на клеточном уровне, которые касаются изменений фенотипа клеток, в первую очередь гладкомышечных (ГМК) и эндотелиальных (ЭК). Многочисленные слои сосудистых ГМК обеспечивают поддержание структуры стенки сосуда, позволяя ей сокращаться и расслабляться, модулируя кровоток. ГМК играют решающую роль в развитии многих ССЗ, в частности АГА и АЗ. Сосудистые ГМК обладают очень высокой степенью пластичности. До недавнего времени среди популяций сосудистых ГМК выделяли классические клетки с сократительным фенотипом, а также дедифференцированные клетки синтетического фенотипа. Однако

развитие технологии секвенирования РНК единичных клеток показало, что такие дедифференцированные сосудистые ГМК очень разнообразны, и на сегодняшний день не существует единого мнения о реальном количестве их фенотипов. Центральным дедифференцированным типом сосудистых ГМК является мезенхимоподобный фенотип. Мезенхимоподобные ГМК способны трансдифференцироваться в фибробластоподобные, макрофагоподобные, остеогенные и адипоцитоподобные ГМК, которые участвуют в развитии различных сердечно-сосудистых заболеваний. Ключевым событием, запускающим процесс переключения фенотипа, является активация транскрипционного фактора KLF4 (Küppel-подобный фактор 4) и деактивация генов, связанных с сигнальным путём TGF- β (рецептор TGF- β 1/2, SMAD2/3 или TGFB2/3), а также снижение экспрессии регуляторных микроРНК, например miR-143/145. Последние необходимы как раз для формирования классического сократительного фенотипа ГМК. В нашем продолжающемся исследовании мы прорабатываем подходы к изучению особенностей функционирования клеток, входящих в состав интимы и медиа аорты человека, в условиях воздействия на них факторов, аналогичных таковым при развитии атеросклероза как коморбидной для АГА патологии. В качестве модели мы выбрали две группы клеток — эндотелиальные и гладкомышечные клетки. Источником патологического воздействия выступает стимуляция фагоцитоза нативными атерогенными частицами липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), выделенными от больных с ССЗ, и латексными шарами. Данную стимуляцию для эндотелиальных клеток предваряли обработкой полиэтиленгликолем с целью получения на их основе гигантских многоядерных клеток, появление которых на эндотелии сосуда, согласно некоторым источникам, провоцирует развитие атеросклероза. Помимо проведения функциональных тестов, мы разработали несколько вариантов лентивирусных векторов, увеличивающих экспрессию в клетке агонистов и антагонистов факторов клеточной дифференцировки. Так, нами созданы клеточные линии дедифференцированных сосудистых ГМК с повышенной экспрессией c-MYC, KLF4, hTERT в различных комбинациях. На этапе тестирования находятся конструкции, запускающие экспрессию miR-143/145 и компонентов сигнального пути TGF- β . Эти векторы необходимы для стимуляции дифференцировки сосудистых ГМК и могут иметь терапевтический потенциал как средство, стимулирующее формирование классического сократительного фенотипа ГМК. Также в ходе работы было показано, что секреция провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , ФНО α , ИЛ-6, ИЛ-8) под воздействием нативных атерогенных ЛПНП частиц и латексных шаров у ГМК аорты, полученных от больных с АГА, была значительно выше, чем у контрольных клеток, полученных от лиц без данной патологии. Данный факт можно объяснить наличием у больных АГА клеточных популяций ГМК, преактивированных по провоспалительному пути и имеющих макрофагоподобный фенотип, ассоциированный с секрецией провоспалительных цитокинов. Это даёт основания предполагать, что фенотипический переход ГМК может быть ключевым событием при развитии патологического процесса внутри оболочки сосуда, пусковыми факторами которого может быть, в том числе, воздействие атерогенных ЛПНП на эти клетки [3]. Для гигантских многоядерных эндотелиальных клеток было показано, что при аналогичном воздействии атерогенными ЛПНП многоядерные клетки аккумулируют в 1,5 раза больше холестерина, чем типичные эндотелиальные клетки, а также имеют повышенный уровень секреции провоспалительных цитокинов [4, 5]. Полученные данные свидетельствуют, что атерогенные ЛНП, циркулирующие в кровотоке, способны влиять на пути трансдифференцировки ГМК, а недостаточная эффективность эндотелиального барьера может ускорять эти процессы. Кроме того, показана возможность направленного переключения фенотипа ГМК с использованием лентивирусных векторов. Это определяет направление нашей дальнейшей работы по оценке терапевтического потенциала разработанных векторов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (Грант № 22-65-00089) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (НИОКТР № 123030700024-4).

Список литературы

1. Сердечно-сосудистые заболевания. В: Всемирная организация здравоохранения [Internet]. Режим доступа: <https://www.who.int/ru/health-topics/cardiovascular-diseases> Дата обращения: 19.10.2024.
2. Гончарова И.А., Панфилов Д.С., Беляева С.А., и др. Структура коморбидности при аневризме восходящей аорты // Российский кардиологический журнал 2022. Т. 27, № 12. С. 5102. EDN: OKNGZA doi: 10.15829/1560-4071-2022-5102

- 3.** Хованцева У.С., Матвеева Д.К., Чакал Д.А., и др. Фагоцитарная активность и способность к провоспалительной активации гладкомышечных клеток интимы аорты человека в эксперименте // Российский иммунологический журнал. doi: 10.46235/1028-7221-16684-РАА
- 4.** Чердниченко В.Р., Хованцева У.С., Кузьмин В.В., и др. Моделирование процессов трансэндотелиального транспорта ЛПНП и миграции макрофагов // Российский иммунологический журнал. 2024. Т. 27, № 3. С. 499–504. doi: 10.46235/1028-7221-16678-МТР
- 5.** Киселева Д.Г., Зиганшин Р.Х., Фотин Д.П., и др. Проатерогенный протеомный профиль ЛПНП, полученных от пациентов с сахарным диабетом: иммунологические аспекты // Российский иммунологический журнал. 2024. Т. 27, № 2. С. 253–258. EDN: ACXGGO doi: 10.46235/1028-7221-16674-PPP

Мартиросян Я.О. ✉, Назаренко Т.А., Силачев Д.Н., Попов К.В.

Перспективы использования достижений регенеративной медицины в лечении женского бесплодия

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

✉ marti-yana@yandex.ru

Аннотация. Активации функции яичников путем внутрияичникового введения внеклеточных везикул у пациенток с бедным ответом на овариальную стимуляцию может явиться альтернативой программ с использованием ооцитов донора, что позволит этой группе пациентов иметь генетически родных детей.

Ключевые слова: ЭКО; ЭКО/ИКСИ; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; внеклеточные везикулы.

Martirosyan Ya.O., Nazarenko T.A., Silachev D.N., Popov K.V.

Prospects for using achievements of regenerative medicine in the treatment of female infertility

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Activation of ovarian function by intraovarian injection of extracellular vesicles in patients with poor response to ovarian stimulation may be an alternative to programs using donor oocytes, which will allow this group of patients to have genetically related children.

Keywords: IVF; IVF/ICSI; multipotent mesenchymal stromal cells; extracellular vesicles.

Повышение эффективности программ ЭКО у пациенток со сниженным овариальным резервом является самой актуальной проблемой репродуктивной медицины на сегодняшний день. Частота встречаемости «бедного» ответа яичников на гонадотропную стимуляцию в программах ЭКО неуклонно растет, достигая, по мнению ряда специалистов от 5–6% до 35,1% [1]. В последние годы предпринимаются попытки активировать внутрияичниковый фолликулогенез как механическими способами, так и путем введения различных биологически активных средств, имеющих как системное, так и локальное воздействие при непосредственном введении в яичник [2]. Наиболее перспективным, по мнению исследователей, может явиться применение клеточной терапии для активации функции яичников. Экспериментальные исследования на животных показали эффективность использования мезенхимальных стромальных клеток (МСК) для активации внутрияичникового фолликулогенеза [3]. Клинические данные немногочисленны, но они продемонстрировали положительный эффект от введения аутологичных стволовых клеток при «бедном» ответе яичников [4]. Появление работ о механизмах терапевтического воздействия с помощью внеклеточных везикул (ВВ) вызвало смену парадигмы и сформулировало новое направление в регенеративных технологиях — бесклеточные препараты. ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» разработан метод активации функции яичников путем внутрияичникового введения внеклеточных везикул, полученных из мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ВВ-ММСК), у пациенток с многократными безуспешными программами ЭКО в анамнезе и бедным ответом на овариальную стимуляцию. Возможность применения регенеративной терапии в рамках подготовки к проведению программ ЭКО/ИКСИ может явиться перспективной альтернативой программ с использованием ооцитов донора, что позволит этой группе пациентов иметь генетически родных детей.

Работы поддержаны государственным заданием № 122020900123-4.

Список литературы

1. Abu-Musa A., Haahr T., Humaidan P. Novel physiology and definition of poor ovarian response. *Clinical Recommendations // Int J Mol Sci.* 2020. Vol. 21, N 6. doi: 10.3390/ijms21062110
2. Zheng Q., Fu X., Jiang J., et al. Umbilical cord mesen-chymal stem cell transplantation prevents chemotherapy-induced ovarian failure via the NGF/TrkA pathway in rats // *Biomed Res Int.* 2019. Vol. 2019. doi: 10.1155/2019/6539294
3. Liu R., Zhang X., Fan Z., et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice // *Stem Cell Res Ther.* 2019. Vol. 10, N 1. P. 299. doi: 10.1186/s13287-019-1315-9
4. Hagen A., Gorennoi V., Schönermark M.P. Bone graft substitutes for the treatment of traumatic fractures of the extremities // *GMS Health Technol Assess.* 2012. Vol. 8. ID Doc04. doi: 10.3205/hta000102
5. Buigues A., Ramírez-Martin N., Martínez J., et al. Systemic changes induced by autologous stem cell ovarian transplant in plasma proteome of women with impaired ovarian reserves // *Aging (Albany NY).* 2023. Vol. 15, N 24. P. 14553–14573. doi: 10.18632/aging.205400

Марченко Л.Н.¹, Чекина А.Ю.¹✉, Джумова М.Ф.¹, Бутько Л.В.¹, Федулов А.С.¹, Качан Т.В.¹,
Гузов С.А.¹, Василевич И.Б.², Матиевский К.А.², Квачева З.Б.², Волотовский И.Д.²

Эффективность клеточной терапии при патологии роговицы

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

✉ anna.chekina19@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты клеточной терапии патологий роговицы в клинических и доклинических исследованиях с применением культивированных аутологичных лимбальных эпителиальных и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани. Установлено, что перилимбальная инъекция аутологичных стволовых клеток является эффективным методом лечения воспалительно-дистрофических заболеваний роговицы.

Ключевые слова: стволовые клетки; клеточная терапия; патология роговицы; доклинические и клинические исследования.

Marchenko L.N.¹, Chekina A.Yu.¹, Djumova M.F.¹, Butko L.V.¹, Fedulov A.S.¹, Kachan T.V.¹, Guzov S.A.¹,
Vasilevich I.B.², Matievsky K.A.², Kvacheva Z.B.², Volotovskiy I.D.²

Effectiveness of cell therapy in corneal pathology

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

² Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of the Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. The results of cell therapy of corneal pathologies in clinical and preclinical studies using cultured autologous limbal epithelial and mesenchymal stem cells of adipose tissue are presented. It has been established that perilimbal injection of autologous stem cells is an effective method for treating inflammatory-dystrophic diseases of the cornea.

Keywords: stem cells; cell therapy; corneal pathology; preclinical and clinical studies.

Одним из решений проблемы лечения заболеваний роговицы, является применение клеточных технологий: трансплантация аутологичных и аллогенных культивированных мезенхимальных и эпителиальных стволовых клеток [1].

Отобран, освоен и адаптирован метод выделения, культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСК ЖТ) орбиты глаза и подкожной жировой клетчатки. Исследованы морфофункциональные и фенотипические свойства, жизнеспособность, стерильность клеток. Разработана технология наращивания биомассы клеток и приготовления биомедицинского клеточного продукта (БМКП) [2]. Важным этапом разработки метода лечения с использованием БМКП является его доклиническое изучение на экспериментальных животных. Изучена эффективность перилимбальных инъекций аутологичных культивированных ЛЭСК и МСК ЖТ (500 тысяч клеток в 0,5 мл физ. раствора) на экспериментальной модели щелочного ожога роговицы II степени у животных (10 кроликов, 20 глаз). Инъекции МСК ЖТ и ЛЭСК ускоряли эпителизацию ожоговой раны, уменьшали отек стромы и способствовали формированию менее интенсивного помутнения роговой оболочки по сравнению с группой сравнения ($p < 0,05$). Клинические признаки улучшения состояния роговицы в опытной группе наблюдались уже на 3-й день лечения по сравнению с группой сравнения. Признаки выздоровления экспериментальных животных в опытной группе отмечались на 7 дней раньше. Морфологические проявления регенерации

характеризовались восстановлением двуслойного эпителия без полипозного разрастания; имелось сходство структуры основного вещества соединительной ткани роговицы с нормальной.

Клиническое изучение эффективности и безопасности клеточной терапии с применением аутологичных ЛЭСК и МСК ЖТ было проведено на 25 пациентах (25 глаз): 8 женщин и 17 мужчин с воспалительно-дистрофическими заболеваниями роговицы различной этиологии. Средний возраст пациентов составил 51,54 года (от 27 до 79 лет). Для выделения и наращивания биомассы стволовых и прогениторных клеток в условиях культуры предварительно у 5 пациентов производилась эксплантация кератолимбального фрагмента (4×2×1 мм на 12-часовом меридиане) и у 20 пациентов — подкожной жировой клетчатки (5×5×5 мм). После проведения клеточной терапии выраженный терапевтический эффект наблюдался у пациентов с эпителиально-стромальной дистрофией роговицы. По данным оптической когерентной томографии отмечалось уменьшение отека роговицы ($p < 0,05$), просветление стромы роговицы и повышение остроты зрения ($p < 0,05$). При периферических язвенных кератитах на фоне аутоиммунных заболеваний перилимбальные инъекции МСК ЖТ или ЛЭСК способствовали исчезновению роговичного синдрома на первые и вторые сутки после инъекции, быстрой эпителизации роговицы на участках изъязвления. При этом толщина роговицы в оптической зоне не изменялась. Не выявлено достоверной разницы между используемыми типами стволовых клеток (эпителиальными или мезенхимальными) и показателями остроты зрения в ранний и поздний периоды наблюдения после лечения: ЛЭСК — МСК ЖТ ($p > 0,05$); ЛЭСК — ЛЭСК + МСК ЖТ ($p > 0,05$); МСК — ЛЭСК + МСК ($p > 0,05$).

Применение БМКП состоящего из культивированных стволовых клеток глаза, повысило остроту зрения и не вызвало побочных негативных реакций у пациентов с патологией роговицы.

Список литературы

1. Oie Y., Nishida K. Regenerative medicine for the cornea // *Biomed Res Int*. 2013. Vol. 13. ID 428247. doi: 10.1155/2013/428247
2. Квачева З.Б., Василевич И.Б., Чекина А.Ю., и др. Сравнительный анализ методов получения культур стволовых клеток эпителия роговицы человека и создание биосовместимого композита со стволовыми клетками // *Гены и клетки*. 2019. Т. 14, № 4. С. 29–34. EDN: AEPEOS doi: 10.23868/201912029

Масленникова А.К.Ю. ✉, Червякова Я.В.

Разработка биомедицинских клеточных продуктов для генотерапии ВИЧ-инфекции

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

✉ a.k.dorogush@gmail.com

Аннотация. В основе патогенеза синдрома приобретенного иммунодефицита, терминальной стадии ВИЧ-инфекции, лежит дефицит CD4⁺-лимфоцитов. В нашей лаборатории ведется разработка биомедицинских клеточных продуктов для формирования в организме пациента резервуара устойчивых к инфицированию ВИЧ лимфоцитов.

Ключевые слова: ВИЧ; генотерапия; биомедицинский клеточный продукт; CD4⁺-лимфоциты; CD34⁺-гемопоэтические стволовые клетки; лентивирусная трансдукция.

Maslennikova A.K.Yu., Chervyakova Ya.V.

Development of biomedical cell products for gene therapy of HIV infection

Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome, the terminal stage of HIV infection, is based on deficiency of CD4⁺ lymphocytes. In our laboratory, biomedical cell products are being developed to form a reservoir of HIV-resistant lymphocytes in the body of an infected patient.

Keywords: HIV; gene therapy; biomedical cell product; CD4⁺ lymphocytes; CD34⁺ hematopoietic stem cells; lentiviral transduction.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является социально-значимым патогеном. Антитретовирусная терапия не позволяет добиться полной эрадикации вируса из организма, в связи с чем ее применение является пожизненным. При этом для ВИЧ характерно развитие устойчивости к препаратам. Генотерапия является альтернативным развивающимся направлением терапии ВИЧ-инфекции.

В основе патогенеза синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД) — терминальной стадии ВИЧ-инфекции лежит дефицит CD4⁺-лимфоцитов. В нашей лаборатории ведется разработка биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) для терапии ВИЧ, целью которых является формирование у ВИЧ-инфицированных пациентов резервуара CD4⁺-лимфоцитов, устойчивых к инфицированию ВИЧ.

Устойчивость к инфицированию достигается путем внесения с помощью лентивирусной трансдукции в геном целевых клеток защитных последовательностей для GPI-заякоревания на клеточной мембране С-пептидов. С-пептиды — это короткие пептиды из С-концевого гептадного повтора белка gp41 ВИЧ, ингибирующие проникновение ВИЧ в клетку [1].

Работа ведется в двух направлениях: 1 — создание БМКП на основе аутологических CD4⁺ лимфоцитов, 2 — создание БМКП на основе ауто- или гетерологических CD34⁺-гемопоэтических стволовых клеток человека.

Для БМКП на основе CD4⁺-лимфоцитов создан лабораторный протокол получения, показана высокая, до 99% устойчивость модифицированных первичных лимфоцитов к инфицированию ВИЧ и наличие у них селективного преимущества во время инфекции ВИЧ, не зависимо от тропности вируса. При этом модифицированные клетки сохраняют пролиферативный потенциал.

Для создания БМКП на основе гемопоэтических клеток дополнительно разработана генетическая конструкция на основе гена *CXCR4*, усиливающая хемотаксис клеток по действием лиганда SDF-1, что по литературным данным способствует их хомингу и приживлению в организме [2]. Тестирование разработанного вектора для трансдукции гемопоэтических стволовых клеток было проведено на модельной клеточной линии. Модифицированные клетки показали помимо высокой защищенности от инфицирования ВИЧ, усиление активности хемотаксиса более чем в два раза по сравнению с не модифицированными клетками.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1661.

Список литературы

1. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41 // *MBio*. 2022. Vol. 13, N 1. ID e0358921. doi: 10.1128/mbio.03589-21
2. Hongjie H., Germond A., Li C., et al. *In vivo* HSC transduction in rhesus macaques with an HDAd5/3⁺ vector targeting desmoglein 2 and transiently overexpressing *cxcr4* // *Blood Adv*. 2022. Vol. 6, N 15. P. 4360–4372. doi: 10.1182/bloodadvances.2022007975

Матвеева В.А. ✉, Чернышова Н.С., Тамкович С.Н., Селедцова Н.В., Артемьева Л.В., Морозов В.В.

Немного о секретоме мезенхимальных стволовых клеток функционального слоя эндометрия пациенток с хроническим эндометритом

Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Новосибирск, Россия

✉ vam@niboch.nsc.ru

Аннотация. У женщин при развитии ХЭ в секретоме культивируемых мезенхимальных стволовых клеток эндометрия обнаружено повышение относительных уровней miR-24 и miR-101 экзосом и значимое снижение секреции VEGF и MCP-1, по сравнению с секретомом фертильных женщин.

Ключевые слова: эндометрий; хронический эндометрит; мезенхимальные стволовые клетки; секретом; экзосомальные микро-РНК; растворимые факторы секретомы.

Matveeva V.A., Chernyshova N.S., Tamkovich S.N., Seledtsova N.V., Artemyeva L.V., Morozov V.V.

Features of the secretome of MSCs of the functional layer of the endometrium in patients with chronic endometritis

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. In women with the development of CE, an increase in the relative levels of miR-24 and miR-101 exosomes and a significant decrease in the secretion of VEGF and MCP-1 were found in the secretome of cultured endometrial mesenchymal stem cells, compared with the secretome of fertile women.

Keywords: endometrium; chronic endometritis; mesenchymal stem cells; secretome; exosomal microRNA; soluble secretome factors.

Хронический эндометрит (ХЭ), ассоциированный с бесплодием, является одной из краеугольных проблем репродукции [1]. Регенеративный потенциал мезенхимальных стволовых клеток (МСК), осуществляемый, посредством секреции различных хемокинов, цитокинов, трофических факторов и внеклеточных везикул [2, 3], вызывает значительный интерес и в области репродуктивной медицины, поэтому исследование секретомы МСК эндометрия женщин представляет большой интерес. Целью работы стал сравнительный анализ экзосомальных микроРНК и растворимых факторов, ассоциированных с ангиогенезом и иммуносупрессивным эффектом, в кондиционных средах МСК функционального слоя эндометрия пациенток с ХЭ и здоровых женщин.

Образцы пайпель-биопсии функционального слоя эндометрия забирали в стерильных условиях операционного блока у пациенток, с установленным диагнозом хронический метроэндометрит, от которых было получено предварительное информированное согласие. Все образцы были взяты на 8 день менструального цикла. Средний возраст женщин составлял $34,2 \pm 2,1$ года. В анамнезе пациентки имели выкидыши до 8–9 недель. В результате выделения из пайпель образцов мононуклеарных клеток и их культивирования в стандартных условиях (в CO_2 -инкубаторе с 5% содержанием CO_2 , при 37°C , в условиях 100% влажности) были получены культуры клеток, которые согласно критериям Международного общества клеточной терапии [4] являются мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками (эМСК). Внеклеточные везикулы выделяли из кондиционных сред эМСК эндометрия 4 пассажа пациенток с ХЭ ($n = 10$) и здоровых женщин ($n = 6$) с помощью комбинации методов ультрафильтрации, низкоскоростного и ультрацентрифугирования. Экзосомальная природа выделенных внеклеточных везикул была подтверждена методом проточной

цитофлуорометрия, с использованием флуоресцентно-меченных антител против CD9, и трансмиссионной электронной микроскопии [5]. Для оценки уровня экспрессии микроРНК, ассоциированных со стимуляцией ангиогенеза и регуляцией иммунного ответа, из осажденных экзосом выделяли общую РНК, в препаратах которой с помощью ОТ и ПЦР в режиме «реального времени» оценивали уровень экспрессии miR-16, miR-24, miR-92 и miR-101. Уровень секреции в кондиционных средах ЭМСК растворимых белковых факторов TNF- α , IL-6, IL-10, VEGF, MCP-1, участвующих в ангиогенезе и иммуномодуляции, определяли, используя коммерческие наборы (Вектор-Бест, г. Новосибирск).

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием пакета программ Statistica 7.0. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Манна–Уитни при $p < 0,05$.

Показано, что препараты экзосом пациенток с ХЭ содержат большее количество мембранных структур, часть из которых по размеру и морфологии соответствует экзосомам. Анализ относительного уровня экспрессии микроРНК miR-24-3p, miR-92a, miR-101 выявил статистически значимые отличия в составе экзосом кондиционной среды ЭМСК в норме и при патологии для miR-24-3p ($p = 0,014$) и miR-101 ($p = 0,005$), при этом не выявлено отличий в уровне экспрессии miR-92a. По результатам иммуноферментного анализа TNF- α в кондиционной среде ЭМСК не обнаружен. Сравнительный анализ концентрации IL-6, IL-10, VEGF, MCP-1 в кондиционных средах ЭМСК выявил статистически значимые отличия в норме и при патологии для проангиогенного фактора VEGF ($p = 0,0008$) и хемокина MCP-1 ($p = 0,003$), и не выявлено отличий в уровне секреции интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-10.

В исследуемой группе женщин при развитии ХЭ регистрируется повышение относительных уровней miR-24 и miR-101 в составе экзосом и значимое снижение уровней секреции VEGF и MCP-1 в кондиционных средах ЭМСК эндометрия, культивируемых в стандартных условиях.

Список литературы

1. Kotaro K., Hidehiko M., Kohei Y., et al. Chronic endometritis: potential cause of infertility and obstetric and neonatal complications // *Am J Reprod Immun.* 2016. Vol. 75. P. 13–22. doi: 10.1111/aji.12438
2. D'souza N., Rossignoli F., Golinelli G., et al. Mesenchymal stem/stromal cells as a delivery platform in cell and gene therapies // *BMC Medicine.* 2015. Vol. 13. P. 186. doi: 10.1186/s12916-015-0426-0
3. Kordelas L., Rebmann V., Ludwig A-K., et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease // *Leukemia.* 2014. Vol. 28. P. 970–973. doi: 10.1038/leu.2014.41
4. Livshits M., Khomyakova E., Evtushenko E., et al. Isolation of exosomes by differential centrifugation: theoretical analysis of a commonly used protocol // *Sci Rep.* 2015. Vol. 5. P. 17319. doi:10.1038/srep17319
5. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: the International Society for cellular therapy position statement // *Cytotherapy.* 2006. Vol. 8, N 4. P. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905

Матвеев В.А. ✉, Одинцова И.А., Русакова С.Э., Шеладев И.В.

Роль «фантомных» волокон в регенерации скелетной мышечной ткани после компрессионной травмы в эксперименте

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ aqa8691@gmail.com

Аннотация. Механизмы восстановления гистоархитектоники скелета после травмы остаются малоизученными. В исследовании представлены наши наблюдения за фантомными волокнами при компрессионном повреждении мышц и обсуждаются перспективы увеличения пропорциональной регенерации мышц.

Ключевые слова: органоспецифическая регенерация; мышечные волокна; «фантомные» волокна; миосателлиты; мышечная травма; компрессионная травма.

Matveev V.A., Odintsova I.A., Rusakova S.E., Sheladev I.V.

Role of “phantom” fibers in reparative regeneration of skeletal muscle tissue after compression injury in an experimental

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The mechanisms of restoration of skeletal histoarchitecture after injury remain poorly understood. The research presents our observations of phantom fibers in the context of compression muscle injury, and discusses the prospects for increasing the proportional regeneration of muscle.

Keywords: proportional regeneration; muscle fibers; ghost fibers; satellite cells; muscle injury; compression injury.

Несмотря на то что достигнуты большие успехи в исследовании клеточных источников регенерации скелетных мышц, механизмы восстановления их гистоархитектоники после травмы остаются малоизученными.

При повреждении мышц происходит разрушение мышечных волокон, но иногда саркопласт деградирует, а его базальная мембрана сохраняется, формируя «фантомное» волокно. В 2015 году исследовательская группа M. Webster показала, что при травме деления и миграция миосателлитов в основном двунаправленно ориентированы вдоль продольной оси «фантомного» волокна. Переориентация последних влияет на миграционные пути и плоскости деления миогенных прогениторов, вызывая пространственную дезорганизацию новообразованных мышечных волокон [1].

Изучение «фантомных» волокон, особенно механизмов регуляции ими миграции миогенных прогениторов позволит лучше понять, как приблизить структурно-функциональные свойства мышечного регенерата к свойствам интактной мышечной ткани.

Цель исследования — оценить вклад «фантомных» волокон в обеспечение органоспецифической регенерации скелетной мышечной ткани после тяжёлой компрессионной травмы.

Материалом исследования служили фрагменты скелетных мышц бедра задних конечностей половозрелых крыс-самцов линии Вистар. Животные разделялись на 2 группы: интактная (без травмы, $n = 3$), контроль (компрессионная травма, $n = 15$). Животным контрольной группы под наркозом с помощью металлических тисков наносили компрессионную травму (сила компрессии $10–12 \text{ кг/см}^2$, длительность сдавливания 7 часов. Материал для гистологического исследования брали на 1, 3, 7, 14, 21 сутки после компрессии. Материал по стандартной методике заливали в парафин. Гистологические препараты, окрашенные гематоксилином и эозином оцифровывали с использованием цифрового сканирующего микроскопа 3DHISTECH PANNORAMIC

Midi. Морфометрию проводили на цифровых изображениях гистологических препаратов с помощью программы PhotoM 1.21. Для статистической обработки результатов использовали программу Statistica 10.

Скелетная мышечная ткань обладает камбиальным резервом, представленным миосателлитоцитами. При объёмной травме наблюдается дефицит миопрогениторных клеток и неадекватность регуляторных механизмов репарации, которые приводят к образованию функционально неполноценного соединительно-тканномышечного регенерата, что актуализирует вопрос поиска средств, повышающих органоспецифичность регенерации.

Раневой процесс протекает в три периода: воспалительный, пролиферативный, адаптационный. В рамках раневого процесса развёртывается репаративный гистогенез скелетной мышечной ткани, в ходе которого последовательно происходит: 1) активация клеток камбиального резерва с образованием миобластов; 2) пролиферация и экспансия миобластов; 3) слияние миобластов с образованием миосимпластов, ориентация которых отличается от предсуществующих мышечных волокон, что затрудняет или делает невозможной восстановление адекватной иннервации, так как у каждого мышечного волокна имеется определенное место формирования нервно-мышечного синапса.

Топографически в месте повреждения можно выделить: некротическую зону, перинекротическую область. В некротической зоне регенерация идёт по заместительному типу *de novo*. Интерес представляет перинекротическая область, восстановительные процессы в которой сопровождаются образованием «фантомных» волокон. «Фантомное» волокно, по нашему мнению, есть результат субтотальной деструкции и элиминации саркоплазмы мышечного волокна с сохранением его сарколеммы (плазмалемма и базальная пластинка). Макрофаги фагоцитируют некротизированные участки этих волокон, утратившие жизнеспособность, освобождая пространство для направленной миграции миобластов в пределах «фантомного» волокна. «Фантомные» волокна окружены остатками эндомизия, который также участвует в формировании внешнего каркаса «фантомного» волокна, обеспечивая прочность этой структуры, позволяющую сохранить гистоархитектонику восстановленных мышечных волокон.

«Фантомные» волокна облегчают миграцию и интеграцию миобластов, образующихся из миосателлитоцитов. Это природные скаффолды (матрицы), позволяющие восстановить утраченные мышечные волокна путём восстановления саркоплазмы предсуществующих волокон. При этом достигается не только экономия времени и ресурсов на регенерацию волокна, но и сохранение правильного его расположения.

Таким образом, возможности для органоспецифичной регенерации мышечных волокон (или их участков) в составе мышцы обеспечиваются формированием участков мышечных волокон с сохранённой сарколеммой (на гистологических срезах — «фантомные» волокна), что позволяет облегчить и обеспечить направленную миграцию миобластов с последующей интеграцией и адаптацией, результатом которой станет восстановление структуры и функции мышечного волокна.

Список литературы

1. Webster M.T., Manor U., Lippincott-Schwartz J., et al. Intravital imaging reveals ghost fibers as architectural units guiding myogenic progenitors during regeneration // *Cell Stem Cell*. 2016. Vol. 18, N 2. P. 243–252. doi: 10.1016/j.stem.2015.11.005

Матвейчук И.В.¹✉, Розанов В.В.^{1,2}

Роль поверхностного слоя костного имплантата в оценке его структурно-функциональных и остеointegrативных свойств

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

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

✉ mivilar@mail.ru

Аннотация. Представлены данные о роли поверхностного слоя в оценке структурно-функциональных, остеointegrативных свойств костных имплантатов, сведения о современных способах их получения, создании биотест-систем для входного контроля донорского материала, оптимизации и прогнозировании репаративного остеогенеза.

Ключевые слова: поверхностный слой; костный имплантат; биотест-система; остеointegrация; репаративный остеогенез; регенерация; анизотропия; композиционный состав; физико-механическая резка; атравматичность; микротвёрдость.

Matveichuk I.V.¹, Pozanov V.V.^{1,2}

The role of the surface layer of a bone implant in the assessment of its structural-functional and osteointegrative properties

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The data on the role of the surface layer in the assessment of the structural, functional, osseointegrative properties of bone implants, information on modern methods of obtaining them, the creation of biotest systems for the input control of donor material, optimization and prediction of reparative osteogenesis are presented.

Keywords: surface layer; bone implant; biotest-system; osteointegration; reparative osteogenesis; regeneration; anisotropy; composition; physical and mechanical characteristics; atraumaticity; microhardness.

Среди многочисленных задач регенеративной медицины опорно-двигательного аппарата одной из актуальных является создание современных здоровьесберегающих технологий для повышения эффективности реконструктивно-восстановительных операций, сокращения сроков лечения и последующего реабилитационного периода [1–3]. Особое внимание уделяется при этом совершенствованию технологий получения имплантатов природного и искусственного происхождения с целью достижения их высокого качества и оптимизации репаративного остеогенеза. При создании костных имплантатов важным аспектом научных разработок в рамках рассматриваемой задачи является создание биотест-систем [4] для входного контроля донорского материала, оценка его исходных структурно-функциональных особенностей, состава с целью прогнозирования остеointegrативного потенциала [2, 3]. Анализ результатов многолетних исследований авторов [1–5] по изучению закономерностей структуры, особенностей физико-механического поведения образцов компактного вещества костей человека и животных в норме, после различных физико-химических воздействий, механической обработки позволил установить важную роль поверхностного слоя имплантатов. Являясь активной контактной, пограничной зоной с костью реципиента в зоне оперативного воздействия, он должен обладать биологической, химической, механической и структурной совместимостью. В этой связи технологические процессы получения костных имплантатов необходимо разрабатывать с обеспечением

сохранности структурно-функциональных свойств и соблюдением требования атравматичности физико-механических воздействий. Этим требованиям отвечают предложенные авторами и экспериментально апробированные технологии физико-механического разделения (резки) минерализованных биологических тканей с использованием полых цилиндрических и отрезных дисковых фрез. Они отличаются низкой трудоёмкостью, отсутствием нагрева в зоне резки, высоким качеством обработанной поверхности, что делает их предметом выбора и широкого применения в практике остеологических исследований, включая обработку при наличии ограниченного количества костной ткани. Использование указанной технологии позволяет получать костные фрагменты различной формы и типоразмеров. Обеспечение сохранности исходной структуры, композиционного состава, биомеханических свойств поверхностного слоя подтверждают данные определения его микротвёрдости (упруго-пластических свойств) [1, 3, 4]. Результаты структурно-функционального анализа могут служить критерием для оценки реальных свойств при осуществлении экспресс-контроля костных фрагментов. Разработанная авторами методология проведения указанных исследований, предложенные критерии позволяют корректно осуществлять сравнительный количественный анализ с учётом многочисленных биологических (пол, возраст, раса), видовых и методических факторов, а также анизотропии структуры и механических свойств костной ткани. В целях усиления остеointegrативного потенциала поверхностного слоя могут быть использованы различные технологические подходы, обеспечивающие его химическую модификацию посредством деминерализации, деорганификации с увеличением объёма и размеров пор. Такие воздействия способствуют увеличению объёма системы внутрикостных пространств [5], повышению скорости остеointegrации, прорастания костной ткани в имплантат. Возрастание сорбционной способности создаёт возможность для придания специальных (антимикробных, противовирусных и др.) свойств поверхностному слою при пропитке лекарственными средствами и их адресной доставки в зону дефекта.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № FGUU-2022-0008 и при поддержке Междисциплинарной научно-образовательной школы МГУ им. М.В. Ломоносова «Фотонные и квантовые технологии. Цифровая медицина».

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Актуальные проблемы теоретической и клинической ортопедии / под ред. Ю.И. Денисова-Никольского. Москва: Новости, 2005. 336 с. EDN: QLKQVP
2. Краснов В.В., Матвейчук И.В., Розанов В.В. и др. Оптимизация качества поверхностного слоя костных имплантатов с целью повышения их регенеративного потенциала // Гены и клетки. Т. 14, № 3. С. 125. EDN: LZYKWR
3. Матвейчук И.В., Литвинов Ю.Ю., Розанов В.В. Научно-методические основы объективной регистрации состояния поверхностей биологических объектов с использованием инновационных методов // Морфология. 2016. Т. 149, № 3. С. 134–134а. EDN: WJITVP
4. Матвейчук И.В., Розанов В.В. Физико-механические подходы к созданию тест-систем с целью выбора костных фрагментов для медико-биологических приложений. В кн.: Морфология в XXI веке: теория, методология, практика: сборник трудов Международной научно-практической конференции / под ред. С.В. Позябина. Москва: ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА имени К.И. Скрябина, 2024. С. 177–180. EDN: ABIQMP
5. Матвейчук И.В., Розанов В.В. Способы увеличения объёма системы внутрикостных пространств для повышения скорости остеointegrации // Гены и клетки. 2022. Т. 17, № 3. С. 149. EDN: OCKFJR

Маясин Ю.П. ✉, Осинникова М.Н., Осадчая Д.В., Дмитриенко В.С., Ризванов А.А.

Разработка подхода по определению чувствительности клеток рака молочной железы к цисплатину на основе быстрого флуоресцентного окрашивания сфероидов зондами, специфичными для каспазы 3/7

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ mayasin_yuriy@mail.ru

Аннотация. В данной работе рассматривается возможность применения низкомолекулярных зондов для проточной цитометрии CellEvent для флуоресцентной визуализации апоптоза в сфероидных моделях на примере чувствительности клеток рака молочной железы линии MCF7 к цисплатину.

Ключевые слова: сфероиды; рак молочной железы; апоптоз; флуоресцентное окрашивание; химиотерапия

Mayasin Yu.P., Osinnikova M.N., Osadchaya D.V., Dmitrienko V.S., Rizvanov A.A.

Development of an approach to detect the sensitivity of breast cancer cells to cisplatin based on rapid fluorescence staining of spheroids with caspase 3/7-specific probes

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. This study examines the possibility of using low molecular weight probes for CellEvent flow cytometry for fluorescence imaging of apoptosis in spheroid models using the sensitivity of MCF7 breast cancer cells to cisplatin.

Keywords: spheroids; breast cancer; apoptosis; fluorescent staining; chemotherapy.

Несмотря на прогресс в развитии лекарственной терапии онкозаболеваний, остается нерешенной проблема неэффективного скрининга потенциальных молекул-кандидатов, ввиду тестирования на двумерных монослойных клеточных системах. Во-первых, это связано с упрощенным проникновением исследуемых молекул в каждую отдельную клетку в монослое, в то время как в реальной опухоли это распространение может ограничиваться лишь внешними слоями клеток. Известно, что устойчивость опухолевых клеток формируется в том числе за счет взаимодействия с внеклеточным матриксом (ВКМ) и клетками микроокружения. Так, за счет формирования плотной сети межклеточных контактов и секреции ВКМ, трехмерные многоклеточные агрегаты сферической формы (сфероиды), могут стать более перспективной моделью для оценки эффективности туморцидов на этапе исследований *in vitro*. Тем не менее анализ сфероидов при помощи классических тестов на жизнеспособность значительно ограничен, ввиду чего оптимизация новых подходов является перспективным направлением.

В данной работе определяли чувствительность к химиотерапевтическому препарату цисплатину клеток рака молочной железы линии MCF7 в виде монослойной культуры и трехмерных сфероидов при помощи оценки цитотоксичности с использованием пептидных зондов для проточной цитометрии CellEvent™, специфично связывающих ДНК и флуоресцирующих после расщепления активными каспазами 3/7. Помимо этого необходимо было оптимизировать применение описанных зондов для флуоресцентной визуализации при помощи конфокальной микроскопии.

Клетки линии MCF7 культивировали в полной питательной среде DMEM с добавлением L-глутамина и 10% бычьей фетальной сыворотки. Для культивирования сфероидов клетки высевали в 96-луночный круглодонный планшет, предварительно покрытый 1% агарозой по 30 тыс. клеток в лунку и использовали специальную среду с добавлением B27, FGF, EGF. Среду меняли каждые 3 дня по мере формирования сфероида. На 6 день с момента высевания клеток в среду добавляли 2, 4, 8, 16, 32 мкмоль цисплатина и инкубировали в течение 48 часов соответственно. В качестве негативного контроля выступали интактные клетки MCF7, в качестве положительного — культуры с добавлением ДМСО (5%). По окончании периода инкубации, сфероиды и двумерные культуры окрашивали DAPI (20 мкг/мл), SYTOX AADvanced Dead Cell Stain и CellEvent™ Caspase-3/7 Green (1:1000) и инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Промывку от не связавшихся агентов осуществляли в физиологическом растворе в шейкере-инкубаторе в течение 30 минут. Сфероиды переносили на предметные стекла и анализировали при помощи лазерной конфокальной микроскопии.

Суммарно, для каждого варианта опыта было проанализировано по 6 полей зрения и было показано, что LC50 для опухолевых клеток в монослое составляет 10,2 мкмоль цисплатина, а доля клеток в состоянии апоптоза (активация каспаз 3/7) при увеличении концентрации цисплатина возрастала от 6,7% до 84%.

Сфероиды показали сравнительно большую устойчивость к цисплатину — показатель LC50 составил 28,1 мкмоль цисплатина, а доля клеток в состоянии апоптоза при увеличении концентрации цисплатина варьировалась от 1% до 42,9%.

Примечательно, что полученные данные сходятся с данными литературы. Ezzat et al. в своей работе также продемонстрировали примерно двукратно возрастающее значение LC50 для монослойной культуры и сфероидов MCF7 [1]. Данная методика, при меньших затратах времени на окрашивание и анализ продемонстрировала эффективность в отношении флуоресцентной визуализации апоптоза/некроза при помощи конфокальной микроскопии и может использоваться для создания ускоренных протоколов оценки чувствительности сфероидов, как к уже применяющимся в практике, так и к потенциальным лекарственным молекулам.

Список литературы

1. Ezzat A., Fayad W., Ibrahim A., et al. Combination treatment of MCF-7 spheroids by *Pseudomonas aeruginosa* HI1 levan and cisplatin // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2020. Vol. 24. ID 101526. doi: 10.1016/j.bcab.2020.101526

Мелконян К.И. ✉, Асякина А.С., Фоменко А.А., Солоп Е.А.

Влияние матриклеточного белка тенасцина-С на функциональную активность фибробластов кожи человека

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

✉ kimelkonian@gmail.com

Аннотация. В работе показано, что матриклеточный белок тенасцин-С оказывает положительное влияние на пролиферацию фибробластов, стимулирует секрецию VEGF и коллагена в культуральную среду. Вероятно, использование данного белка будет способствовать васкуляризации биоматериалов в регенеративной медицине.

Ключевые слова: тенасцин-С; дермальные фибробласты; ангиогенез; коллаген; регенерация; заживление ран кожи.

Melkonyan K.I., Asyakina A.S., Fomenko A.A., Solop E.A.

Influence of matricellar protein tenascin-C on the functional activity of human dermal fibroblasts

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Abstract. The work shows that the matrix cell protein tenascin-C has a positive effect on fibroblast proliferation and stimulates the secretion of VEGF and collagen into the culture medium. It is possible that the use of this protein will promote the vascularization of biomaterials in regenerative medicine.

Keywords: tenascin-C; dermal fibroblasts; angiogenesis; collagen; regeneration; wound healing.

Для более эффективного заживления ран в регенеративной медицине используют биоматериалы, одним из преимуществ которых является способность к биодеградации, но основным фактором, лимитирующим процессы репарации, является дефицит кровеносных сосудов, что препятствует полноценной интеграции в ткани после трансплантации. Перспективным направлением в вопросе васкуляризации биоматериалов может выступать использование матриклеточных белков, которые характеризуются низким уровнем экспрессии в здоровых тканях, но активно синтезируются во время эмбрионального развития и при различных патологических состояниях. Данные белки влияют на функциональную активность фибробластов, например, на процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, апоптоза, а также могут индуцировать ремоделирование тканей. Одним из малоизученных матриклеточных белков, участвующем, является тенасцин-С (TNC), который участвует в регуляции регенерации кожных ран, в частности оказывает влияние на процессы пролиферации, адгезии и ангиогенеза [1, 2]. При заживлении поверхностных повреждений кожи также важно контролировать процесс коллагеногенеза, т.к. отсутствие синтеза коллагена может привести к образованию хронических ран [3].

Целью нашего исследования являлась оценка функциональной активности дермальных фибробластов при культивировании с матриклеточным белком TNC.

Для оценки влияния TNC на пролиферативную активность клеток использовали дермальные фибробласты, полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных ФГБУН Институт цитологии РАН (линия DF-1). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия) на 48-луночных планшетах при 37°C и концентрации 5% CO₂ в количестве

10 000 клеток на лунку. Рекombинантный белок TNC (Cloud-clone Corp., США) добавляли в следующих концентрациях: 10 нг/мл, 50 нг/мл, 100 нг/мл. В качестве положительного контроля выступал FGF (фактор роста фибробластов) (Cloud-clone Corp., США) в концентрации 50 нг/мл, в качестве отрицательного контроля — клетки, культивирующиеся только в питательной среде. Через 48 часов инкубации учитывали количество клеток в камере Горяева в трех итерациях для каждого образца. Концентрацию коллагена I типа и VEGF (васкуло-эндотелиальный фактор роста) в кондиционной среде определяли с помощью тест-системы для ИФА (Cloud-clone Corp., США) согласно инструкции производителя.

В контрольных лунках количество клеток увеличилось в среднем в 3,75 раз, а в лунке с положительным контролем — в 9,34 раза. При добавлении TNC в концентрации 10 нг/мл число клеток возросло в 4,25 раз от их начального количества. Инкубация с TNC в концентрации 50 нг/мл и 100 нг/мл привела в значимому росту количества фибробластов (в 9,25 раз и в 9,57 раз соответственно) по сравнению с отрицательным контролем и не отличалось от положительного контроля. Концентрация коллагена I типа при культивировании в присутствии TNC в концентрации 10 нг/мл составила $9,26 \pm 0,95$ нг/мл, при 50 нг/мл TNC — $9,28 \pm 0,08$ нг/мл, при 100 нг/мл TNC — $10,33 \pm 0,04$ нг/мл, в отрицательном контроле — $9,12 \pm 0,16$ нг/мл, в положительном контроле — $16,26 \pm 8,09$ нг/мл. Результаты показали, что добавление TNC в различных концентрациях не оказало влияния на синтез коллагена фибробластами в отличие от положительного контроля. При определении концентрации VEGF в супернатантах было выявлено, что культивация клеток в питательной среде и с TNC в концентрации 10 нг/мл не приводит к синтезу данного фактора роста, при добавлении 50 нг/мл TNC его содержание в пробах составило $85,63 \pm 12,88$ нг/мл, в концентрации 100 нг/мл — $5,96 \pm 1,71$ нг/мл, при инкубации с FGF — $1,18 \pm 0,23$ нг/мл.

Полученные результаты позволяют предположить, что TNC может способствовать пролиферации фибробластов, индукции секреции ими коллагена I типа и VEGF. Таким образом, использование матричного белка TNC, в качестве активного компонента биоматериалов, оказывающего стимулирующее влияние на клетки кожи, вероятно сможет сократить сроки заживления или снизить риск развития длительно незаживающих ран.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-25-20083 и при финансовой поддержке Кубанского научного фонда в рамках проекта № 24-25-20083.

Список литературы

1. Roberts D.D. Emerging functions of matricellular proteins // *Cell Mol Life Sci.* 2011. Vol. 68, N 19. P. 3133–3136. doi: 10.1007/s00018-011-0779-2
2. Midwood K.S., Chiquet M., Tucker R.P., et al. Tenascin-C at a glance // *J Cell Sci.* 2016. Vol. 129, N 23. P. 4321–4327. doi: 10.1242/jcs.190546
3. Максимова Н.В., Люндуп А.В., Любимов Р.О., и др. Патофизиологические аспекты процесса заживления ран в норме и при синдроме диабетической стопы // *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014. Т. 69, № 11–12. С. 110–117. EDN: RHQYBU doi: 10.15690/vramn.v69i11-12.1192

Мельник А.П. ✉, Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Создание модели для изучения возраст-зависимых изменений стромальных клеток эндометрия

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ amelnik200018@mail.ru

Аннотация. Индуцибельная экспрессия эндонуклеазы I-PpoI вызывает эпигенетическое старение клеток. Создана линия генетически модифицированных эндометриальных стромальных клеток.

Ключевые слова: стволовые клетки; эндометрий; клеточное старение.

Melnik A.P., Deryabin P.I., Borodkina A.V.

Creating a model for studying age-dependent changes in endometrial stromal cells

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The inducible expression of endonuclease I-PpoI causes epigenetic cell aging. A line of genetically modified endometrial stromal cells has been created.

Keywords: stem cells; endometrium; cell senescence.

Возрастное снижение женской фертильности традиционно связывают с измененным гормональным фоном, состоянием яичников, ухудшением качества ооцитов, что, с свою очередь, приводит к увеличению вероятности появления генетически аномальных эмбрионов и неудачам имплантации. В последнее время исследователями также учитывается вклад эндометриального фактора в растущее с возрастом число неудач имплантации. Изучение молекулярных и функциональных аспектов старения эндометриальных стромальных клеток (ЭСК), являющихся основным структурным компонентом эндометрия, может внести вклад в разработку новых подходов, направленных на повышение эффективности вспомогательных репродуктивных технологий у женщин среднего и позднего репродуктивных периодов. Наиболее очевидным подходом для изучения данной проблемы является сравнительный анализ линий ЭСК, полученных от доноров разного возраста. Однако реализация данного подхода сопряжена со множеством технических трудностей. Во-первых, необходима большая выборка здоровых доноров, для проведения корректного сравнительного анализа. Во-вторых, вариабельность длинны менструального цикла не позволяет унифицировать образцы биопсии от разных доноров разного возраста. В качестве альтернативной стратегии мы оценили возможность использования моделей эпигенетического старения. Модель, использованная в данной работе, основана на индуцибельной экспрессии редкощепящей эндонуклеазы I-PpoI. Выбор данной стратегии основан на информационной теории старения, которая гласит, что возраст-ассоциированные изменения в клетках возникают в результате эрозии эпигенетического ландшафта, в результате точной репарации повреждений ДНК. В ходе данного процесса белки, поддерживающие структуру хроматина, перемещаются к местам повреждений, и вследствие многочисленных актов репарации происходит смещение их локализации на хроматине. В результате описанных процессов происходит размытие эпигенетического ландшафта, постепенная потеря клеточной идентичности, нарушение в функционировании клеток и, наконец, к старению. Эндонуклеаза I-PpoI приводит двухнитевые разрывы исключительно в интронных областях генов. При этом, преимущество данной эндонуклеазы состоит в том, что ее деятельность ведет к гораздо более низкой скорости мутаций, чем другие способы создания двухнитевых разрывов ДНК, такие как CRISPR, химические вещества и радиация.

Таким образом, репарация двухнитевых разрывов, вносимых I-PpoI, приводит к смещению белков к местам репарации, что вызывает эпигенетическое старение клеток в условиях *in vitro*. Цель работы заключалась в создании системы для индуцибельной экспрессии эндонуклеазы I-PpoI, получение генетически-модифицированной линии эСК для исследования возраст-зависимых изменений клеток. Первым этапом работы была кодон оптимизация последовательности кДНК эндонуклеазы I-PpoI для человека, так как описанный подход был разработан на клетках мышей [1]. Далее была произведена сборка последовательности I-PpoI из коротких олигонуклеотидных фрагментов при помощи ПЦР. Далее полученный фрагмент был клонирован в лентивектор. Для обеспечения индуцибельной экспрессии система состояла из двух векторов, которые были получены путем молекулярного клонирования. Для получения линии эСК проводили последовательную трансдукцию сначала первой системой, содержащую регуляторную последовательность Tet-operator, которая представляет сайт связывания белка репрессора TetR, кодирующийся во втором векторе. При помощи данной системы экспрессия I-PpoI запускается только при добавлении в среду клеток тетрациклина. Таким образом, была получена система индуцибельной экспрессии редкощепящей эндонуклеазы I-PpoI и выведена линия генно-модифицированных клеток эСК для дальнейшего изучения возраст-зависимых изменений стромальных клеток эндометрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-10002).

Список литературы

1. Yang J.H., Hayano M., Griffin P.T., et al. Loss of epigenetic information as a cause of mammalian aging // Cell. 2023. Vol. 186, N 2. P. 305–326.e27. doi: 10.1016/j.cell.2022.12.027

Мельникова А.А. ✉, Гривцова Л.Ю.

Разработка оптимизированной схемы получения зрелых дендритных клеток из моноцитов периферической крови человека

Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России, Обнинск, Россия

✉ angelik_melnikova@mail.ru

Аннотация. Благодаря способности перекрестно представлять антигены, наивным Т-клеткам, дендритные клетки играют важную роль в генерации противоопухолевых реакций. В работе описана технология создания дендритно-клеточной вакцины, нагруженной опухолевыми антигенами, источником которых служил опухолевый лизат.

Ключевые слова: дендритные клетки; иммунотерапия; антигенпрезентирующие клетки; ДК-вакцины; опухолеассоциированные антигены.

Melnikova A.A., Grivtsova L.Yu.

Development of an optimized scheme for the production of mature dendritic cells from human peripheral blood monocytes

A.F. Tsyb Medical Radiological Research Center — branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia, Obninsk, Russia

Abstract. Due to their ability to cross-present antigens associated with tumor cells to naive T cells, dendritic cells play an important role in generating specific T-cell-mediated antitumor effector responses in controlling tumor growth and tumor cell dissemination. Clinical trials in this area have demonstrated the possibility of immunotherapy based on dendritic cells. This paper describes the technology of creating a dendritic cell vaccine loaded with tumor antigens, the sources of which were tumor lysate.

Keywords: dendritic cells; immunotherapy; antigen-presenting cells; DC-vaccines; tumor-associated antigens.

Глубокое изучение механизмов регуляции молекулярного взаимодействия между Т-лимфоцитами и опухолевыми клетками, в сочетании с прогрессом в области генной инженерии Т-клеток и идентификацией опухолеспецифических антигенов, привело к разработке инновационных иммунотерапевтических подходов к лечению рака. Данные подходы демонстрируют беспрецедентную клиническую эффективность.

Эти методы лечения направлены на активацию и распространение опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов с целью уничтожения первичных раковых клеток. Современные методы иммунотерапии рака включают применение ингибиторов иммунных контрольных точек, иммунотерапию *ex vivo* методом адоптивного переноса либо нативных клеток (клоны CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов, TIL-клетки из опухоли-инфильтрирующих лимфоцитов), либо Т-клеток, сконструированных для экспрессии Т-клеточного рецептора (TCP, TCR) или химерного антигенного рецептора (CAR), а также противораковые вакцины на основе опухолеспецифических антигенов (пептидов или РНК) [1–3].

Представление о том, что иммунная система может быть использована с помощью вакцинации для уничтожения злокачественных клеток, неоднократно демонстрировалась на животных моделях. Клинические испытания показали, что модифицированные опухолевые клетки безопасны и оказывают положительное влияние на противоопухолевую иммунную память. Одним из основных преимуществ вакцин против цельных опухолевых клеток является их способность представлять весь спектр опухолеассоциированных антигенов иммунной системе пациента [4].

В свою очередь, успех иммунотерапии рака зависит от индукции иммунных эффекторных механизмов, связанных с образованием опухолеспецифических цитотоксических Т-лимфоцитов с высокой авидностью. Преодоление путей иммунной толерантности в микроокружении опухоли, которые могут снижать эффективность иммунотерапевтических подходов, является актуальной темой в области иммунологии опухолей и иммунотерапии. В этом контексте оптимизация терапевтического потенциала иммунной системы зависит от комбинации различных подходов, в основном противораковых вакцин, которые синергетически усиливают противоопухолевый Т-клеточный ответ.

Дендритные клетки (ДК) являются центральным звеном для инициации антиген-специфического иммунитета. Являясь профессиональными антигенпрезентирующими клетками, они могут захватывать и представлять на клеточной мембране различные чужеродные белки, опухолевые антигены для активации Т- и В-лимфоцитов.

Цель работы — оптимизация методики получения зрелых ДК из моноцитов периферической крови человека.

Материалы и методы. ДК получали культивированием моноцитов периферической крови (МПК) человека в условиях CO₂-инкубатора (37°C, 5% CO₂) в полной питательной среде PRMI-1640, содержащей ГМ-КСФ и ИЛ-4.

Анализ иммунофенотипа клеток проводили на проточном цитофлуориметре FACS CANTO II, исследуя экспрессию следующих антигенов: CD14⁻, CD1a^{low}, CD83^{high}, HLA-DR^{high}, CD80^{high}, CD86^{high}, CCR7^{high}.

На 7-е сутки культивирования для праймирования ДК вносили опухолеассоциированные антигены, источником которых служил опухолевый лизат, полученный при последовательных циклах замораживания и оттаивания опухолевых клеток. После осуществления 2-часовой инкубации к ДК для индукции дифференцировки добавляли: фактор некроза опухоли-α (TNFα) и простагландин E2 (ПГЕ2).

Используя инвертированный микроскоп, мы оценивали форму, размер и адгезивные свойства культивируемых клеток на протяжении экспериментальной работы.

Алгоритм процедуры криоконсервации ДК осуществлялся следующим образом: ДК клетки ресуспендировали в среде для замораживания, состоящей из 90% аутологичной плазмы и 10% диметилсульфоксида. Затем маркированные криопробирки переносили в жидкий азот для длительного хранения.

В ходе работы отработана методика культивирования и нагрузки ДК опухолевыми антигенами, источниками которых служил лизат. Подобраны оптимальные условия культивирования ДК. Ключевыми цитокинами являются ГМ-КСФ (конечная концентрация 80 нг/мл) и ИЛ-4 (конечная концентрация 10 нг/мл). Для полного созревания к незрелым дендритным клеткам добавляли индукторы дифференцировки: TNF α, ПГЕ2. Предложенный метод использования дендритных клеток, нагруженных опухолевыми антигенами, может стать новым направлением в клинической практике.

Список литературы

1. Sahin U., Derhovanessian E., Miller M. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer // *Nature*. 2017. Vol. 547, N 7662. P. 222–226. doi: 10.1038/nature23003
2. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma // *N Engl J Med*. 2010. Vol. 363, N 8. P. 711–723. doi: 10.1056/NEJMoa1003466
3. Miller M.J., Foy K.C., Kaumaya P.T. Cancer immunotherapy: present status, future perspective, and a new paradigm of peptide immunotherapeutics // *Discov Med*. 2013. Vol. 15, N 82. P. 166–176.
4. Guo C., Manjili M.H., Subjeck J.R. Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future // *Adv Cancer Res*. 2013. Vol. 119. P. 421–475. doi: 10.1016/B978-0-12-407190-2.00007-1

Мельникова Е.В. ✉

Обеспечение качества препаратов клеточной терапии, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация. Работа посвящена вопросам характеристики и контроля качества препаратов клеточной терапии, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; клеточная терапия; качество для клинического применения.

Melnikova E.V.

Quality assurance of cell therapy preparations derived from induced pluripotent stem cells

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract. The work is devoted to the issues of characterization and quality control of cell therapy preparations derived from induced pluripotent stem cells.

Keywords: induced pluripotent stem cells; cell therapy; quality for clinical use.

Индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК) являются перспективным инструментом не только для моделирования заболеваний человека на клеточном уровне, проведения исследований по обоснованию механизма действия, оценке эффективности и токсических эффектов лекарственных препаратов, но и могут быть использованы в качестве исходного материала для получения препаратов клеточной терапии. Это особенно актуально в случае необходимости применения редких типов клеток, которые не могут быть выделены от человека (например, нейроны), или, когда качество выделенных первичных клеток не позволяет их использовать для разработки препарата (например, в случае наличия мутаций или высокой гетерогенности). В настоящее время проводятся клинические исследования начальных фаз препаратов, содержащих дифференцированные клетки, полученные из ИПСК, по таким показаниям, как хронический ишемический инсульт (NCT06299033), возрастная дегенерация желтого пятна (NCT04339764, NCT05445063), сердечная недостаточность (NCT04396899, NCT04945018, NCT03763136, NCT04982081), злокачественные опухоли (NCT05336409, NCT06241456, NCT03841110), диабет 1 типа и др. [1, 2].

Качество клеток, полученных из ИПСК, для клинического применения должно быть обеспечено, начиная с исходных материалов — клеток, полученных от донора, собственно ИПСК или созданных банков и заканчивая готовым продуктом, содержащим целевые дифференцированные клетки. Требования к донорам биологического материала и характеристика ИПСК или банков их клеток должны максимально снизить основные риски применения таких препаратов, включая образование тератом и иммуногенность. Необходим комплексный подход к характеристике ИПСК, банков клеток и готового продукта, включая описание морфологических характеристик, жизнеспособности, аутентификацию клеток (например, методом коротких tandemных повторов), оценку стерильности, содержания бактериальных эндотоксинов, микоплазмы, идентичности (например, фенотипирование с помощью проточной цитометрии, тестирование *in vivo* на плюрипотентность или методом ПЦР на экспрессию генов плюрипотентности), генетической стабильности (кариотипирование, анализ однонуклеотидных полиморфизмов, анализ опухоль-ассоциированных

последовательностей генома методом секвенирования), чистоты (остаточное содержание ДНК транскрипционных факторов методом ПЦР, остаточное содержание вектора), примесей [3, 4].

Для трансдифференцированных из ИПСК клеток контроль качества готового продукта будет зависеть от типа дифференцированных клеток, особое внимание должно быть уделено чистоте (отсутствию недифференцированных ИПСК, других промежуточных клеточных продуктов производства со стадий перепрограммирования, культивирования и редактирования генов, например, в случае генетических модификаций аллогенных ИПСК с целью предотвращения иммунного отторжения или реакции «трансплантат против хозяина»; или появления клеток с новыми иммуногенными эпитопами). В плане клинической эффективности клеток, полученных из ИПСК, основной проблемой остается неполное их созревание.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 05600026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер гос. учета НИР 124022200093-9).

Список литературы

1. Cerneckis J., Cai H., Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications // *Signal Transduct Target Ther.* 2024. Vol. 9, N 1. P. 112. doi: 10.1038/s41392-024-01809-0
2. Ramzy A., Thompson D.M, Ward-Hartstonge K.A., et al. Implanted pluripotent stem-cell-derived pancreatic endoderm cells secrete glucose-responsive C-peptide in patients with type 1 diabetes // *Cell Stem Cell.* 2021. Vol. 28, N 12. P. 2047–2061. doi: 10.1016/j.stem.2021.10.003
3. Beckenkamp L.R., da Silva C.G., Hohendorff M.L.I., et al. Manufacturing parameters for the creation of clinical-grade human-induced pluripotent stem cell lines from umbilical cord mesenchymal stromal cells // *Stem Cells Transl Med.* 2024. Vol. 13, N 5. P. 454–461. doi: 10.1093/stcltm/szae010
4. Zhang Y., Wei J., Cao J., et al. Requirements for human-induced pluripotent stem cells // *Cell Prolif.* 2022. Vol. 55, N 4. doi: 10.1111/cpr.13182

Мензоров А.Г.^{1,2}✉, Минина Ю.М.¹, Воинова В.Ю.^{3,4}, Сафонова М.П.³, Лагарькова М.А.⁵,
Воловиков Е.А.⁵, Пристяжнюк И.Е.¹

Новые линии ИПСК для моделирования синдрома Коэна

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Научно-исследовательский клинический институт педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

⁵ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

✉ menzorov@bionet.nsc.ru

Аннотация. Синдром Коэна — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, вызываемое гомо- или компаунд-гетерозиготными вариантами в гене *VPS13B*. Новые линии ИПСК, полученные из клеток пациента с синдромом Коэна с ранее не охарактеризованными вариантами *VPS13B*, могут использоваться для изучения функций *VPS13B*.

Ключевые слова: ИПСК; синдром Коэна.

Menzorov A.G.^{1,2}, Minina J.M.¹, Voinova V.Yu.^{3,4}, Safonova M.P.³, Lagarkova M.A.⁵,
Volovikov E.A.⁵, Pristyazhnyuk I.E.¹

Novel iPSC lines for Cohen syndrome modeling

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Veltischev Research and Clinical Institute for Pediatrics and Pediatric Surgery of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ The Mental Health Research Center, Moscow, Russia

⁵ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Cohen syndrome is a rare autosomal recessive genetic disorder caused by homozygous or compound heterozygous variants in the *VPS13B* gene. Novel iPSC lines from a Cohen syndrome patient with previously uncharacterized *VPS13B* variants could be used for the study of *VPS13B* functions.

Keywords: iPSCs; Cohen syndrome.

Синдром Коэна — редкое аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, характеризующееся задержкой развития, умственной отсталостью, микроцефалией, нейтропенией, диморфизмами, ожирением, а также офтальмологическими и аутистическими расстройствами [1]. Заболевание вызывается гомозиготными или компаунд гетерозиготными вариантами гена *VPS13B*. В базе данных ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) имеется 195 вариантов гена *VPS13B*, связанных с синдромом Коэна. Белок *VPS13B* локализован в комплексе Гольджи и участвует в транспорте липидов между клеточными мембранами, везикулярном трафике и аутофагии. Он имеет много доменов, функция некоторых неизвестна. Ранее мы получили пациент-специфичные индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) из фибробластов и моноцитов двух пациентов с синдромом Коэна. Так как в числе проявлений синдрома Коэна есть неврологические симптомы, для их изучения мы получили из ИПСК нейральные стволовые клетки и нейроны. Эти клетки имели многочисленные аномалии на ультраструктурном уровне [2]. Мы решили расширить число доступных генотипов линий ИПСК для изучения функциональной значимости различных вариантов гена

VPS13B, а также функций конкретных доменов белка *VPS13B*. Мы получили несколько новых линий ИПСК из фибробластов еще одного пациента с синдромом Коэна, носителя компаунд гетерозиготных вариантов гена *VPS13B* (8:g.99766811A>G и 8:g.99859429G>A, HG38) с неясным клиническим значением. Протокол получения ИПСК был описан ранее [3]. Фибробласты репрограммировали с помощью эписомальных векторов Epi5 (Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование клеток проводили в ЦКП ИЦиГ СО РАН «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL) при поддержке государственного проекта FWNR-2022-0019. Наличие вариантов гена *VPS13B* подтвердили секвенированием по Сэнгеру. Линии ИПСК имели нормальный диплоидный кариотип и экспрессировали маркеры плюрипотентности OCT4, NANOG и SSEA-4. Плюрипотентность была подтверждена анализом экспрессии маркерных генов трех зародышевых листков в эмбрионных тельцах. Полученные новые линии ИПСК с ранее не описанными вариантами гена могут быть использованы для изучения функций *VPS13B*.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1063).

Список литературы

1. Seifert W., Holder-Espinasse M., Kühnisch J., et al. Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of *COH1* // *Hum Mutat.* 2009. Vol. 30, N 2. P. E404–420. doi: 10.1002/humu.20886
2. Shnaider T.A., Khabarova A.A., Morozova K.N., et al. Ultrastructural abnormalities in induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells and neurons of two Cohen syndrome patients // *Cells.* 2023. Vol. 12, N 23. P. 2702. doi: 10.3390/cells12232702
3. Pristyazhnyuk I.E., Meshcheryakov N.I., Nikitina T.V., et al. Generation of induced pluripotent stem cell line iTAF15Xsk4 from fibroblasts of a patient with microdeletion at Xq24 // *Russ J Dev Biol.* 2023. Vol. 54. P. 358–364. doi: 10.1134/S1062360423060073

Мензул В.А.¹ ✉, Егоров Е.Е.²

Лечение ран в собственной жидкой среде (по В.А. Мензулу)

¹ ФГКУЗ «Главный военный клинический госпиталь войск национальной гвардии Российской Федерации», Балашиха, Россия

² ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН», Москва, Россия

✉ menzul@yandex.ru

Аннотация. Хирург В.А. Мензул с 1993 года применяет «мокрый» способ лечения ран. Рану закрывают пленочной повязкой «МензулДермМД» и стерильная интерстициальная жидкость увлажняет и очищает рану от патогенов. В результате сокращается время нетрудоспособности и уменьшаются страдания пациентов.

Ключевые слова: комбустиология; лечение ожогов; лечение ран; МензулДермМД; интерстициальная жидкость; собственная жидкая среда.

Menzul V.A.¹, Yegorov Ye.E.²

Wound treatment in its own liquid medium (according to V.A. Menzul)

¹ Main Military Clinical Hospital of the National Guard Troops of the Russian Federation, Balashikha, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

Abstract. Surgeon Menzul V.A. has been using the “wet” method of wound treatment since 1993. The wound is closed with a film dressing “MenzulDermMD” and sterile interstitial fluid moisturises and cleans the wound of pathogens. As a result, the time of incapacity for work is shortened and patient suffering is reduced.

Keywords: combustiology; burns treatment; wound care; MenzulDermMD; interstitial fluid; own liquid medium.

При ранениях кожи происходит разрушение гидроизолирующего слоя эпидермиса, и интерстициальная жидкость начинает вытекать наружу. Сам по себе этот процесс является проявлением защитной функции кожи, при котором стерильная интерстициальная жидкость очищает рану от патогенов и доставляет в зону раны иммунные клетки. Аналогично ведет себя кровь, но этот процесс быстро прекращается за счёт гемостаза. На поверхности раны возникает струп, защищающий живые ткани от высыхания и инфицирования. При традиционном способе лечения ран применяют марлевые и марле-мазевые повязки. Они высыхают, и при их смене происходит повторное травмирование раны. Кроме того, перевязки приходится менять неоднократно; в случае ожоговых и огнестрельных ран процедура перевязки настолько болезненна, что требует применение общего наркоза. Хирург-комбустиолог Василий Александрович Мензул, начиная с октября 1993 года применяет «мокрый» способ лечения ран. Поверхность раны закрывают стерильной одноразовой пленочной повязкой «МензулДермМД» для консервативного лечения в условиях собственной жидкой среды (СЖС). Также поверх пленки располагают стерильные марлевые повязки, которые играют роль тампонов, впитывающих избыточное количество СЖС, вытекающей из-под подвязочного пространства. Проведено более 1500 таких операций. В результате отмечено снижение риска повторной травматизации тканей, и как следствие уменьшение страданий больного, а также сокращения числа поднаркозных перевязок. При лечении повязками «МензулДермМД» на поверхности раны формируется особый слой васкуляризированной фибринолейкоцитарной оболочки, который позволяет проводить на него аутодермопластику инновационным сетчатым трансплантатом с кожной перемычкой без предварительного иссечения слоев грануляционной ткани раневой поверхности. Причем по окончании операции, пересаженные трансплантаты и места донорских ран закрывают повязками «МензулДермМД» для лечения их в условиях СЖС. Смену повязок производят каждые 48 ч в течение 8–14 дней. Разработанный способ лечения позволяет

улучшить результаты по сравнению с традиционным методом, сокращая время нетрудоспособности пациента. Фактически рана сама постоянно промывается неким стерильным аналогом физиологического раствора с низким содержанием белка. При использовании латекса (пленки или спрея) образуется влажная рана, но без санации, что может приводить к осложнениям. Пленочная повязка «МензулДермМД», обработана с внутренней стороны порошкообразной смесью витамина В₂ и специального мыла, что способствует регулированию регенерации ткани и снижает риск инфицирования. После восстановления гидроизолирующей функции кожи, такие повязки уже не требуются.

Меркулов М.В.¹ ✉, Астрелина Т.А.¹, Усупжанова Д.Ю.¹, Брунчуков В.А.¹, Завьялов А.О.¹, Маливанова Т.Ф.¹, Кобзева И.В.¹, Сучкова Ю.Б.¹, Булычева Ю.И.¹, Никитина В.А.¹, Михадаркина О.Г.¹, Дубова Е.А.¹, Лишук С.В.¹, Павлов К.А.¹, Цимахович А.О.², Серова О.Ф.², Самойлов А.С.¹

Эффективность препарата гидрогеля при лечении радиационных поражений кожи у лабораторных животных

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ МО Московский областной перинатальный центр, Балашиха, Россия

✉ merkulovmark848@gmail.com

Аннотация. Лечение местных лучевых поражений остаётся актуальной проблемой. В представленном исследовании продемонстрирована положительная динамика течения раневого процесса МЛП у лабораторных животных после применения препаратов гидрогеля из лиофилизата децеллюляризованных тканей человека.

Ключевые слова: ранозаживление кожи; модели повреждения кожи *in vivo*; регенеративная медицина; биоматериалы; биосовместимые и биodeградируемые гидрогели.

Merkulov M.V.¹, Astrelina T.A.¹, Usupzhanova D.Yu.¹, Brunchukov V.A.¹, Zavyalov A.O.¹, Malivanova T.F.¹, Kobzeva I.V.¹, Suchkova Yu.B.¹, Bulycheva Yu.I.¹, Nikitina V.A.¹, Mikhadarkina O.G.¹, Dubova E.A.¹, Lischuk S.V.¹, Pavlov K.A.¹, Tsimakhovich A.O.², Serova O.F.², Samoilov A.S.¹

Efficiency of a hydrogel preparation in the treatment of radiation-induced skin lesions in laboratory animals

¹ State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Moscow Regional Perinatal Center, Balashikha, Moscow Region, Russia

Abstract. The treatment of local radiation injuries remains an urgent problem. The presented study demonstrates the positive dynamics of the LRI wound process of laboratory animals after treatment of hydrogel from lyophilizate of decellularized human tissues.

Keywords: skin wound healing; models of skin damage *in vivo*; regenerative medicine; biomaterials; biocompatible and biodegradable hydrogels.

Несмотря на очевидный прогресс методов лучевой терапии, повреждение здоровых тканей, остаётся неизбежным последствием данной процедуры [1]. Степень выраженности лучевых реакций зависит от полученной дозовой нагрузки, до первых клинических проявлений может пройти несколько недель, в некоторых случаях развивается местное лучевое поражение (МЛП) кожи. Лечение МЛП кожи продолжает оставаться серьёзной проблемой из-за механизмов, лежащих в основе радиационно-индуцированных поражений, в частности, образования большого количества активных форм кислорода и сопутствующего повторяющегося воспалительного микроокружения, в комплексе приводящих к длительному заживлению раны и, зачастую, рецидиву заболевания [2]. Таким образом, вопрос разработки новых методов терапии МЛП кожи остаётся весьма актуальным. За последнее десятилетие появилось множество исследований, демонстрирующих терапевтическую эффективность препаратов гидрогелей из внеклеточного матрикса (ВКМ) тканей в лечении поражений различного генеза [3]. Основными преимуществами подобных гидрогелей является многокомпонентный состав (коллагены различных типов, ламинин, фибронектин, гликозаминогликаны, ростовые факторы), обуславливающий высокий регенеративный потенциал, а также превосходная

биосовместимость. Недостатком подобных препаратов являются слабые механические свойства, поэтому с целью повышения удобства эксплуатации и замедления процесса биодеградации, возможны различные модификации гидрогелей из ВКМ, в частности, методом химической сшивки [4]. Лабораторные животные (самцы крыс линии Wistar, $n = 15$) с МЛП кожи были разделены на 3 группы: контрольная группа без лечения, опытная группа с лечением препаратом гидрогеля, полученного из лиофилизата децеллюляризованных тканей человека, и опытная группа с лечением препаратом гидрогеля, модифицированного генипином (GNP: 0,2 мМ). Планиметрические исследования течения раневого процесса показали, что опытные группы животных быстрее достигают значений площади (S) открытой раневой поверхности (ОРП) в ~30% от общей S поражения, в сравнении с группой контроля, не получающей лечения. Также на 119 сутки полное заживление МЛП и полное отсутствие ОРП (0%) наблюдалось у 40% животных в опытной группе, получавшей терапию в виде препарата гидрогеля. В то же время опытная группа животных, получавших терапию в виде препарата гидрогеля, модифицированного GNP, демонстрировала снижение площади ОРП (с 28 по 119 сутки) в среднем по группе в 6,15 раз, для группы контроля это значение составило — 3,49. Результаты гистологических исследований показали, что в опытной группе животных, получавшей терапию препаратом гидрогеля, отмечалась преимущественно слабая воспалительная инфильтрация. Также в данной группе у животных отмечалось заживление МЛП и, как следствие, полное отсутствие воспалительной инфильтрации и зоны некроза, наличие единичных волосяных фолликул, высокий уровень EGF, FGF2. Таким образом, при планиметрическом, гистологическом и иммуногистохимическом исследованиях показано, что препараты гидрогелей оказывают положительное влияние на динамику течения раневого процесса, однако, не модифицированный препарат гидрогеля обладает наиболее высоким регенеративным потенциалом.

Список литературы

1. Borrelli M.R., Shen A.H., Lee G.K., et al. Radiation-induced skin fibrosis: pathogenesis, current treatment options, and emerging therapeutics // *Ann Plast Surg*. 2019. Vol. 83, № 4S. P. S59–S64. doi: 10.1097/SAP.0000000000002098
2. Wang Y., Chen S., Bao S., et al. Deciphering the fibrotic process: mechanism of chronic radiation skin injury fibrosis // *Front Immunol*. 2024. Vol. 15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1338922
3. Zhang M., Zhao X. Alginate hydrogel dressings for advanced wound management // *Int J Biol Macromol*. 2020. Vol. 162. P. 1414–1428. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.311
4. Tokareva M.I., Ivantsova M.N., Mironov M.A. Heterocycles of natural origin as non-toxic reagents for cross-linking of proteins and polysaccharides // *Chem Heterocycl Comp*. 2017. Vol. 53. P. 21–35. doi: 10.1007/s10593-017-2016-x

Мжаванадзе Н.Д. ✉, Калинин Р.Е., Сучков И.А., Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Назимова Е.Ю.,
Маркитан Г.С., Сеидкулиева А.А., Некрасова М.С.

Влияние биофлавоноидов на экспрессию маркера клеточной сенесценции в стенке подкожных вен при варикозной болезни *in vitro*

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

✉ nina_mzhavanadze@mail.ru

Аннотация. Биофлавоноиды диосметин и гесперетин влияют на экспрессию биомаркера клеточной сенесценции PAI-1 в стенке вен *in vitro*: диосметин в концентрации 500 нг/мл снижал экспрессию PAI-1 на 44,8% ($p < 0,0001$), гесперетин в концентрации 150 нг/мл — на 22,1% ($p < 0,01$), а их комбинация — на 37,0% ($p < 0,0001$).

Ключевые слова: PAI-1; клеточная сенесценция; гомогенат стенки вены; биофлавоноиды; диосметин; гесперетин; варикозная болезнь.

Mzhavanadze N.D., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Schulkin A.V., Abalenikhina Yu.V., Nazimova E.Yu.,
Markitan G.S., Seidkulieva A.A., Nekrasova M.S.

Influence of bioflavonoids on the expression of a marker of cellular senescence in varicose veins *in vitro*

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. Bioflavonoids diosmetin and hesperetin affect the expression of the biomarker of cellular senescence PAI-1 in the vein wall *in vitro*: diosmetin at a concentration of 500 ng/ml reduced the expression of PAI-1 by 44.8% ($p < 0.0001$), hesperetin at a concentration of 150 ng/ml — by 22.1% ($p < 0.01$), and their combination — by 37.0% ($p < 0.0001$).

Keywords: PAI-1; cell senescence; vein wall homogenate; bioflavonoids; diosmetin; hesperetin; varicose veins.

Традиционно клеточная сенесценция (КС) рассматривалась в контексте изучения развития и прогрессирования атеросклероза и структурной патологии сердца, при этом роль данного процесса в патогенезе варикозной болезни нижних конечностей (ВБНК), одного из наиболее распространенного заболевания сосудов, остаётся не до конца изученной. К одним из важных маркёров КС в настоящее время относят ингибитор активации плазминогена 1 типа (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1), активно продуцируемый элементами сосудистой стенки, преимущественно эндотелиоцитами [1]. PAI-1 может быть задействован в сложных процессах ремоделирования венозной стенки, в том числе посредством эндотелиально-мезенхимального перехода [2]. Целью данного исследования явилась оценка влияния биофлавоноидов (диосметин, гесперетин) как компонентов одних из наиболее часто используемых препаратов в лечении пациентов с ВБНК, на экспрессию PAI-1 в стенке варикозно трансформированных вен. Субстанции диосметин и гесперетин были предоставлены ООО «Биннофарм Групп» в рамках проведения научно-исследовательской работы «Изучение влияния биофлавоноидов на ремоделирование венозной стенки у пациентов с варикозной болезнью нижних конечностей», зарегистрированной на портале ClinicalTrials NCT06367166.

В качестве объекта исследований использовали образцы вен, полученные от пациентов с варикозной болезнью вен нижних конечностей C2s–C3s по классификации CEAP. Забор материала проводился после подписания пациентами информированного согласия, во время процедуры минифлебэктомии. В клеточной

лаборатории ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России образцы вены разделяли на фрагменты и помещали в лунки 6 луночного планшета. Далее проводилась инкубация участков вен с исследуемыми веществами: в питательную среду опытных лунок добавляли диосметин в концентрациях 500, 50 и 5 нг/мл, гесперетин в концентрациях 150, 15 и 1,5 нг/мл или их комбинацию в концентрациях 500 и 150, 50 и 15, 5 и 1,5 нг/мл соответственно. В контрольные лунки добавляли 1% раствор ДМСО — растворитель диосметина и гесперитин в эквивалентном объеме. На каждый эксперимент было по 3 повторения. После окончания инкубации из образцов вен готовили гомогенаты. Далее проводился вестер-блот для оценки экспрессии PAI-1 с использованием антител AF5176 PAI 1 Antibody (Affinity Biosciences, Китай); содержание PAI-1 оценивалось относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody, GA1R), DyLight 68 (Invitrogen, США). Дополнительно образцы вен после экспериментальных воздействий подвергались иммуногистохимическим исследованиям с антителами к изучаемому белку.

Диосметин в концентрациях 50 и 5 нг/мл, гесперетин в концентрациях 15 и 1,5 нг/мл и их комбинации 50 и 15 нг/мл и 5 и 1,5 нг/мл достоверного влияния на экспрессию PAI-1 в венозной стенке не оказали. В то же время по сравнению с контролем диосметин в концентрации 500 нг/мл снижал экспрессию PAI-1 на 44,8% ($p < 0,0001$), гесперетин в концентрации 150 нг/мл — на 22,1% ($p < 0,01$), а их комбинация — на 37,0% ($p < 0,0001$). Диосметин по эффективности снижения экспрессии маркера клеточной сенесценции PAI-1 был сопоставим с влиянием комбинации с гесперетином, а гесперетин уступал по эффективности двум данным группам, однако изменения не были статистически значимыми. При иммуногистохимическом исследовании было показано, что иммунопозитивную реакцию давали эндотелиальные клетки. Применение тестируемых веществ снижало интенсивность иммунопозитивной реакции. При этом стоит отметить, что даже и в контроле иммунопозитивная реакция была слабоинтенсивной.

Список литературы

1. Vaughan D.E., Rai R., Khan S.S., et al. Plasminogen activator inhibitor-1 is a marker and a mediator of senescence // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017. Vol. 37, N 8. P. 1446–1452. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309451
2. Wei W.F., Zhou H.L., Chen P.Y., et al. Cancer-associated fibroblast-derived PAI-1 promotes lymphatic metastasis via the induction of EndoMT in lymphatic endothelial cells // *J Exp Clin Cancer Res.* 2023. Vol. 42. P. 160. doi: 10.1186/s13046-023-02714-0

Милутинович К.С.¹ ✉, Собянин К.А.², Попов В.С.¹

Недостаточность слизистой оболочки кишечника у мышей, нокаутных по гену *Muc2*, не гарантирует развитие хронического воспаления

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

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

✉ milutinovicks@my.msu.ru

Аннотация. *Muc2*^{-/-} мыши демонстрируют проявление клинических и гистологических симптомов ВЗК. Вариабельность литературных данных ставит под сомнение эффективность оценки тяжести заболевания и лечения. В этой работе мы наглядно демонстрируем несоответствие наблюдаемых симптомов литературным данным.

Ключевые слова: *Muc2*^{-/-} мыши; ВЗК; гистология; воспаление.

Milutinovich K.S.¹, Sobyenin K.A.², Popov V.S.¹

Insufficiency of the intestinal mucosa in mice knocked out by the *Muc2* gene does not guarantee the development of chronic inflammation

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. *Muc2*^{-/-} mice show clinical manifestations and histological symptoms of IBD. Variability in the literature calls into question the effectiveness of disease severity assessment and treatment. In this work we see a demonstrated discrepancy between the observed symptoms and the literature data.

Keywords: *Muc2*^{-/-} mice; IBD; histology; inflammation.

У мышей с нокаутом гена муцина2 (*Muc2*^{-/-}), созданных для моделирования колоректального рака, в литературе многократно описано проявление симптомов, характерных для пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Помимо отсутствия детектируемых бокаловидных клеток, для нокаутных животных свойственно наличие удлиненных ворсинок по сравнению с контрольными животными. Это патологическое изменение наблюдается уже с пятой недели жизни. Оно наиболее выражено в дистальном отделе толстого кишечника, и с двенадцатой недели начинает прогрессировать, сопровождаясь активной инфильтрацией иммунных клеток. Классическая объяснительная схема наблюдаемой патологии подразумевает нарушение барьера слизистой, контакт кишечной микрофлоры с иммунной системой и, как следствие, — развитие хронического воспалительного процесса. В итоге, патогенетический процесс, вызванный отсутствием муцинового слоя, приводит к развитию аденокарцином тонкого и толстого кишечника у *Muc2*^{-/-} мышей уже с 6-го месяца жизни [1, 2].

Характерным признаком ВЗК у *Muc2*^{-/-} животных является увеличение длины кишечника, в связи с чем мы измерили длину тонкого и толстого кишечника животных, выраженную в миллиметрах. Длина тонкого кишечника не отличалась у нокаутных самцов (4–12 мес.) по сравнению с контрольными животными ($p = 0,7$; $N = 9$ и 10 , здесь и далее сначала указывается количество контрольных животных, затем нокаутных), не наблюдалось отличий и в длине толстого кишечника ($p = 0,36$; $N = 9$ и 10). Длина тонкого и толстого кишечника не отличалась у *Muc2*^{-/-} самок (4–12 мес.) по сравнению с контрольными самками

($p = 0,14$ и $p = 0,18$ соответственно; $N = 12$ и 7). По длине отделов кишечника не было обнаружено статистически значимых отличий как между самцами и самками дикого типа ($p > 0,7$; $N = 9$ самцов и 12 самок), так и между нокаутными самцами и самками ($p > 0,2$; $N = 10$ самцов и 7 самок). В связи с тем, что не было обнаружено статистически значимых межполовых отличий, дальнейший гистологический анализ мы проводили только у самцов.

У *Muc2*^{-/-} мышей описано удлинение кишечных ворсинок, которое по нашим наблюдениям, совпавшим с литературными данными, происходит в следствие гиперплазии — увеличения числа энтероцитов. Мы измерили длину ворсинок, выраженную в количестве энтероцитов на ворсинку. Сравнение нокаутов с контролем (4–12 мес.) показало, что длина ворсинки статистически значимо больше у *Muc2*^{-/-} мышей (в среднем $15,94$ клеток на ворсинку у животных дикого типа и в среднем $25,5$ у нокаутных), ($p = 0.0004$, $N = 18$ и 16). Также признаком развития воспаления является увеличение количества иммунных клеток в ткани кишечника, которое мы измеряли как количество иммунных клеток в подслизистом слое и внутри ворсинок. Как и ожидалось, уровень иммунного инфильтрата был значимо выше у нокаутных животных (в среднем по $32,25$ иммунные клетки в поле зрения) по сравнению с контрольными (в среднем по $22,5$ иммунные клетки в поле зрения) ($p = 0.03$, $N = 18$ и 16), хотя обнаруженная разница очень небольшая.

Классическое описание патологии у *Muc2*^{-/-} мышей подразумевает хроническое системное воспаление, которое подтверждают путем измерения провоспалительных цитокинов [3]. В нашем случае уровень TNF-а не отличался у нокаутных самцов по сравнению с контрольными животными ($p = 0.25$; $N = 13$ и 15), а также у нокаутных самок по сравнению с самками дикого типа ($p = 0.076$; $N = 8$ и 6). Не наблюдалось и межполовых отличий в уровне TNF-а как у дикого типа, так и у нокаутов ($p = 0.97$; $N = 8$ и 13 и $p = 0.38$: $N = 6$ и 15 соответственно).

Основным результатом сравнения в нашем случае является отсутствие признаков хронического воспаления, которое должно было бы выражаться в значительном увеличении длины ворсинки, кратном увеличении иммунного инфильтрата, а также наличие абсцессов и опухолевых образований. Наши мыши демонстрировали незначительное увеличение количества иммунных клеток и длины ворсинок, абсцессов и изъязвлений мы не обнаружили.

Мы также не наблюдаем статистической разницы в уровне TNF-а в крови животных, свидетельствующего о наличии воспаления [3]. Мы провели вскрытие 13 мышей в возрасте от 6 до 12 месяцев с целью обнаружить у них опухоли, однако ни макроскопических, ни гистологических признаков опухолеобразования найти не смогли.

Наши данные свидетельствуют о вариативности развития патологии у мышей *Muc2*^{-/-}. Дальнейшие исследования мы собираемся направить на выяснение непосредственных условий развития хронического воспаления, сопровождающегося опухолеобразованием. Мыши *Muc2*^{-/-} могут быть удачной моделью для исследования регуляции пролиферации кишечного эпителия без хронического воспаления.

Список литературы

1. Van der Sluis M., De Koning B.A., De Bruijn A.C., et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection // *Gastroenterology*. 2006. Vol. 131, N 1. P. 117–129. doi: 10.1053/j.gastro.2006.04.020
2. Wenzel U.A., Magnusson M.K., Rydström A., et al. Spontaneous colitis in Muc2-deficient mice reflects clinical and cellular features of active ulcerative colitis // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 6. ID e100217. doi: 10.1371/journal.pone.0100217
3. Feofanova N.A., Bets V.D., Borisova M.A., et al. L-fucose reduces gut inflammation due to T-regulatory response in Muc2 null mice // *PLoS One*. 2022. Vol. 17, N 12. ID e0278714. doi: 10.1371/journal.pone.0278714

Минайчев В.В.^{1,2} ✉, Тетерина А.Ю.^{1,2}, Кобякова М.И.^{1–3}, Смирнов И.В.^{1,2}, Смирнова П.В.^{1,2}, Шлыков М.А.^{2,4}, Салынкин П.С.^{1,2}, Сенотов А.С.¹, Михайлов Е.С.⁵, Пятина К.В.^{1,2}, Фадеев Р.С.^{1,2}, Баринов С.М.², Комлев В.С.², Фадеева И.С.^{1,2}

Остеоиммунологический ландшафт определяет биологическую совместимость кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом

¹ ФГБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН», Пущино, Россия

² ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН», Москва, Россия

³ НИИ Клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵ Филиал ФГБУН «Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Пущино, Россия

✉ vminaychev@gmail.com

Аннотация. В работе исследовались иммуногенные свойства различных кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом. Полученные результаты открывают путь к созданию эффективных и безопасных кальций-фосфатных материалов с иммунорегуляторными свойствами для регенерации костной ткани.

Ключевые слова: остеопластические материалы; иммуногенность; кальций-фосфаты; дикальций фосфат дигидрат; октакальций фосфат; гидроксиапатит.

Minaychev V.V.^{1,2}, Teterina A.Yu.^{1,2}, Kobyakova M.I.^{1–3}, Smirnov I.V.^{1,2}, Smirnova P.V.^{1,2}, Shlykov M.A.^{2,4}, Salynkin P.S.^{1,2}, Senotov A.S.¹, Mikhailov E.S.⁵, Pyatina K.V.^{1,2}, Fadeev R.S.^{1,2}, Barinov S.M.², Komlev V.S.², Fadeeva I.S.^{1,2}

Osteoimmunological landscape determines biocompatibility of calcium phosphate compounds obtained by low-temperature synthesis

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

² Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Branch of Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Abstract. The immunogenic properties of various calcium phosphate compounds obtained by low-temperature synthesis were investigated in the work. The obtained results open the way to the creation of effective and safe calcium phosphate materials with immunoregulatory properties for bone tissue regeneration.

Keywords: osteoplastic materials; immunogenicity; calcium phosphates; dicalcium phosphate dihydrate; octacalcium phosphate; hydroxyapatite.

Высокая вариабельность биологических эффектов синтетических кальций-фосфатных соединений (КФС), используемых для регенерации костной ткани, представляет собой важную проблему реконструктивной хирургии. КФС могут стимулировать регенерацию, но также существует риск отторжения имплантатов из-за неконтролируемого воспаления, что может быть связано как с особенностями синтеза и резорбции материалов, так и с иммунным статусом пациентов. Воспалительный процесс важен для регенерации тканей, и его исследование необходимо для повышения регенеративных свойств материалов. При этом регенеративные

и иммуногенные свойства низкотемпературных КФС недостаточно изучены. В данной работе исследовали иммуногенные свойства дикальций фосфат дигидрата (ДКФД), октакальций фосфата (ОКФ) и гидроксиапатита (ГАп), полученных методом низкотемпературной химической трансформации. Исследования проводились при нормальных и воспалительных условиях *in vitro*, а также в модели латентного воспаления *in vivo*.

Для формирования модельного воспаления *in vitro* клетки обрабатывали липополисахаридом (ЛПС). На основании предварительно проведенного исследования цитотоксичности для работы использовали КФС в концентрации 1 мг/мл. Влияние КФС оценивали через 72 часа их инкубации с клетками по содержанию кислых компартментов (КК), продукции активных форм кислорода (АФК) и уровню про- и противовоспалительных цитокинов.

Обнаружено, что все исследованные КФС снижали фагоцитарную активность как неактивированных (ЛПС-), так и активированных ЛПС (ЛПС+) макрофагов (МКФ). В ЛПС- МКФ после инкубации со всеми КФС увеличивалось содержание КК, при этом в ЛПС+ клетках их содержание увеличивалось только после инкубации с ГАп. ДКФД и ГАп не оказывала влияния на продукцию АФК в ЛПС- и ЛПС+ моноцитах (МН), в то время как ОКФ увеличивал данный параметр только в ЛПС- МН. В ЛПС-МКФ наблюдалось увеличение продукции АФК клетками, инкубировавшихся с ДКФД и ОКФ, но не с ГАп, при этом обработка клеток ЛПС снижала продукцию АФК после инкубации со всеми КФС.

Исследование показало, что КФС оказывают разнонаправленное влияние на продукцию провоспалительных цитокинов в МН и МКФ. Так, ДКФД снижал продукцию интерлейкина-6 (ИЛ-6) как в ЛПС+, так и ЛПС- МН в два раза и не оказывал влияния на продукцию ФНО- α . Инкубация МКФ с КФС приводила к увеличению ФНО- α и ИЛ-1 β в ЛПС+ клетках, в то время как ИЛ-6 увеличивался только в ЛПС- клетках.

При изучении влияния КФС на секрецию остеобластоподобными клетками МG-63 противовоспалительных цитокинов ИЛ-13 и VEGF обнаружили, что VEGF не изменялся после инкубации со всеми КФС как в ЛПС+, так и ЛПС- клетках. Однако после инкубации с ЛПС- клетками ДКФД, ОКФ и ГАп *de novo* секретировался ИЛ-13, наибольшее содержание которого наблюдалось после инкубации с ОКФ. ИЛ-13 в культуральной среде ЛПС+ клеток МG-63 увеличивался после инкубации с ДКФД. Также инкубация с ГАп полностью подавляла секрецию ИЛ-13 ЛПС+ клетками.

Исследование влияния ДКФД, ОКФ и ГАп на лектин-зависимую активацию Т- и В-лимфоцитов периферической крови человека показало отсутствие влияния КФС на активацию как Т-клеток, так и В-клеток при совместной инкубации. Таким образом, КФС могут оказывать разнонаправленное действие на функции клеток врожденного иммунитета (МН и МКФ), но не влияют на активацию клеток адаптивного иммунитета (Т- и В-клетки).

Для создания модели латентного воспаления (сенситизации) *in vivo* использовали А1А-модель с помощью инъекции полного адьюванта Фрейнда (ПАФ). Для оценки биосовместимости КФС проводили гетеротопическую имплантацию сроком 3 недели.

Реакция организма несенситизированных экспериментальных животных на КФС показала, что наиболее благоприятная реакция наблюдалась на ДКФД. При этом материал ОКФ был менее биосовместим, проявлял слабый токсический эффект, но оказывал выраженное ангиогенное действие. В свою очередь вокруг ГАп формировалась многослойная фиброзная капсула, вне которой наблюдалось реактивное воспаление в тканях дермы. Таким образом, ГАп являлся наименее биосовместимым.

В условиях ПАФ-индуцированного воспаления вокруг всех КФС происходило увеличение толщины фиброзной капсулы, однако ДКФД и ОКФ способствовали образованию большего количества микрососудов. ГАп имел выраженный анти-ангиогенный эффект, т.е. блокировать репаративные процессы в организме.

Таким образом, полученные данные подчеркивают важность учета иммунного статуса реципиента при использовании КФС. Среди исследованных КФС ДКФД обладает наиболее выраженными анти-воспалительными свойствами и может быть материалом выбора для пациентов с неясным или отягощенным иммунным статусом. Полученные результаты открывают путь к созданию материалов на основе КФС с иммунорегуляторными свойствами для эффективной регенерации костной ткани.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке фонда РНФ в рамках проекта № 21-73-20251 с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН и ФИБХ РАН.

Минязева И.С.¹✉, Синягина М.Н.², Гарифулин Р.Р.¹, Калямова А.В.¹, Гайнуллин И.И.¹,
Агаев А.М.¹, Сираева А.Р.¹, Фадеев Ф.О.¹, Измаилов А.А.¹

Биоинформатический анализ транскриптома генетически модифицированных лейкоцитов мини-свиней

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ irmin98@yandex.ru

Аннотация. В исследовании изучены изменения транскриптома лейкоцитов вьетнамских вислобрюхих мини-свиней после трансдукции химерным аденовирусным вектором Ad5/F35-GFP. Выявлены гены, связанные с противовирусной защитой и иммунным ответом.

Ключевые слова: РНК-секвенирование; аденовирусный вектор; мини-свины; лейкоконцентрат.

Minyazeva I.S.¹, Sinyagina M.N.², Garifulin R.R.¹, Kalyamova A.V.¹, Gainullin I.I.¹, Agaev A.M.¹,
Siraeva A.R.¹, Fadeev F.O.¹, Izmailov A.A.¹

Bioinformatics analysis of the transcriptome of genetically modified mini-pig leukocytes

¹ Kazan State Medical University, Kazan, Russia

² Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. The study examined transcriptomic changes in the leukocytes of Vietnamese pot-bellied mini-pigs after transduction with the chimeric adenoviral vector Ad5/F35-GFP. Genes related to antiviral defense and immune response were identified.

Keywords: RNA sequencing; adenoviral vector; mini-pigs; Leukoconcentrate.

Одним из перспективных направлений генной терапии является использование модифицированных аденовирусов с измененными белками фибров для улучшения специфичности клеточной трансдукции и снижения иммуногенности. Важным аспектом таких исследований является оценка биобезопасности аденовирусных векторов как в клеточных моделях, так и в условиях эксперимента на крупных животных, анатомические, физиологические и биохимические характеристики которых подобны человеку. Цель данного исследования — транскриптомный анализ лейкоцитов мини-свиней, трансдуцированных химерным аденовирусным вектором, состоящего из репликативно-дефектного аденовируса человека 5 серотипа с фибром аденовируса 35 серотипа и несущего репортерный ген зеленого флуоресцентного белка GFP (Ad5/F35-GFP).

Лейкоциты вьетнамских вислобрюхих мини-свиней выделяли из периферической крови и трансдуцировали с помощью Ad5/F35-GFP со значением MOI (множественность инфекции) = 10 в течение 8 часов. После отмывки лейкоциты культивировались в течение 72 часов для подтверждения экспрессии GFP и последующего транскриптомного анализа. Эффективность трансдукции оценивали методом флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Для изучения транскриптомных изменений в GFP-позитивных клетках проводили РНК-секвенирование. Всего было создано 12 библиотек кДНК на основе клеток, полученных как из контрольной группы (нативные лейкоциты, $n = 6$), так и из GFP-позитивных клеток ($n = 6$). После секвенирования данные были обработаны с использованием стандартных методов биоинформатики, включая анализ дифференциальной экспрессии генов и функциональный анализ с использованием Gene Ontology (GO).

Флуоресцентная микроскопия генетически модифицированных лейкоцитов продемонстрировала наличие GFP-позитивных клеток через 72 часа после трансдукции, что подтверждало успешную экспрессию репортерного гена. Проточная цитометрия показала, что около 1,8% лейкоцитов продуцировали GFP. Результаты РНК-секвенирования обнаружили выраженные различия в транскриптомах GFP-позитивных и нативных лейкоцитов. Из установленных 19 210 генов, значительное количество которых демонстрировало дифференциальную экспрессию между группами. Анализ главных компонент (PCA) также показал, что транскрипционные профили GFP-позитивных клеток отличались от клеток контрольной группы, несмотря на индивидуальные различия образцов.

Функциональный анализ с использованием базы данных Gene Ontology показал, что большинство дифференциально экспрессируемых генов были вовлечены в биологические процессы, связанные с ответом на вирусную инфекцию, в том числе с активацией противовирусной защиты и регуляцией ответа на интерферон 1-го типа, а именно, сдерживание провоспалительных сигнальных каскадов и выработку цитокинов. Эти результаты подчеркивают, что трансдукция аденовирусом Ad5/F35 приводит не только к экспрессии целевого гена, но и вызывает изменения, связанные с иммунным ответом.

Таким образом, вьетнамские вислобрюхие мини-свиньи обладают генетически обусловленной низкой чувствительностью к химерному аденовирусному вектору Ad5/F35, о чем свидетельствуют низкий процент трансдукции лейкоцитов и изменения транскриптома, сдерживающие выработку цитокинов. Это говорит о том, что иммунная толерантность мини-свиней к данной векторной системе позволит оценить эффективность генной терапии без побочных явлений, обусловленных иммунным ответом.

Миронова Е.С.^{1,2} ✉

Пептидная регуляция направленной дифференцировки стволовых клеток

¹ АННО ВО НИЦ «Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

✉ katrine1994@mail.ru

Аннотация. Известно, что одним из проявлений старения является ослабление дифференцировочной способности стволовых клеток. Исследования доказали, что пептиды могут эпигенетически регулировать экспрессию различных групп генов, в том числе ответственных за дифференцировку клеток в организме.

Ключевые слова: дифференцировка; стволовые клетки; пептиды; экспрессия генов; клеточное старение.

Mironova E.S.^{1,2}

Peptide regulation of directed stem cell differentiation

¹ Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, Saint Petersburg, Russia

² Saint-Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, Saint Petersburg, Russia

Abstract. One of the manifestations of aging is the weakening of the differentiation capacity of stem cells. Studies have shown that peptides can epigenetically regulate the expression of various groups of genes, including those responsible for cell differentiation in the organism.

Keywords: differentiation; stem cells; peptides; gene expression; cellular aging.

В многоклеточном организме все клетки приспособлены для выполнения определенных функций и все они совершенно разные. При этом набор генов всех этих клеток одинаков, за редкими исключениями (например, эритроциты человека не имеют ядра, а в иммунных клетках происходят генетические перестройки). В каждой клетке работают далеко не все гены, а только их определенный набор. В зависимости от того, какой набор генов экспрессируется в данной клетке, она принадлежит к тому или иному клеточному типу.

По мере формирования многоклеточного организма происходит дифференцировка клеток — включение и выключение определенных генов и специализация клетки для выполнения тех или иных функций, приобретение ею черт того или иного клеточного типа.

В многоклеточном организме поддержание тканевого гомеостаза (постоянство) обеспечивают так называемые стволовые клетки — это недифференцированные предшественники одного или нескольких клеточных типов. Известно, что одним из проявлений старения является ослабление дифференцировочной способности стволовых клеток. Исследования доказали, что пептиды могут эпигенетически регулировать экспрессию различных групп генов, в том числе ответственных за дифференцировку клеток в организме [1].

Из полипептидного комплекса (ППК) слизистой оболочки бронхов молодых животных, был синтезирован тетрапептид AEDL (Ala-Glu-Asp-Leu).

Изучали влияние пептида AEDL на дифференцировку эмбриональных клеток легких человека при помощи метода количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР). Обнаружено, что пептид AEDL способствует повышению экспрессии генов, участвующих в дифференцировке бронхиального эпителия: NKX2-1, SCGB1A1, SCGB3A2, FOXA1 и FOXA2 [2].

Из ППК поджелудочной железы молодых животных, был синтезирован тетрапептид KEDW (Lys-Glu-Asp-Trp).

Установлено, что при старении клеток поджелудочной железы экспрессия маркеров дифференцировки в них снижается. Тетрапептид KEDW стимулирует экспрессию факторов дифференцировки ацинарных

(Pdx1, Ptfla) и островковых (Pdx1, Pax6, Pax4, Foxa2, NKx2.2) клеток поджелудочной железы в «молодых» и «старых» культурах [3].

Из ППК вилочковой железы (тимуса) молодых животных, был синтезирован дипептид KE (Lys-Glu).

Исследовали влияние ППК тимуса на дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток человека. Установлено, что ППК снижал экспрессию маркеров дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток CD44 и CD117. Также ППК тимуса повышал экспрессию маркера зрелых Т-лимфоцитов CD28. Это свидетельствует о том, что под действием ППК CD117⁺-клетки дифференцируются в зрелые CD28⁺ Т-лимфоциты [4].

Дипептид KE стимулировал дифференцировку предшественников Т-клеток тимуса в направлении CD4⁺ клеток (Т-хелперов) в культурах клеток тимуса крысы и человека [5].

Дифференцировка клеток сопровождается появлением у них способности к выполнению специализированных функций в организме. Таким образом ППК и входящие в их состав короткие пептиды обеспечивают поддержание функциональных свойств различных систем организма.

Так, влияние пептида AEDL на дифференцировку клеток легких может лежать в основе бронхопротекторного действия пептидов бронхов на моделях воспалительных заболеваний, фиброза и токсического поражения легких. В свою очередь, индуцируемая пептидом KEDW дифференцировка островковых и ацинарных клеток поджелудочной железы может являться одним из механизмов при лечении диабета и противовоспалительного действия пептидов поджелудочной железы при терапии панкреатита. Кроме того, способность пептидов тимуса стимулировать дифференцировку нативных лимфоцитов подтверждает их иммуномодулирующую активность. Таким образом, пептиды тимуса могут рассматриваться как препараты для профилактики вирусных инфекций, действие которых выражается в компенсаторной стимуляции Т-лимфоцитов при снижении иммунитета.

Список литературы

1. Khavinson V., Linkova N., Diatlova A., et al. Peptide regulation of cell differentiation // *Stem Cell Rev Rep*. 2020. Vol. 16, N 1. P. 118–125. doi: 10.1007/s12015-019-09938-8
2. Khavinson V.Kh., Tendler S.M., Vanyushin B.F., et al. Peptide regulation of gene expression and protein synthesis in bronchial epithelium // *Lung*. 2014. Vol. 192, N 5. P. 781–791. doi: 10.1007/s00408-014-9620-7
3. Khavinson V.K., Durnova A.O., Polyakova V.O., et al. Effects of pancragenon on the differentiation of pancreatic cells during their ageing // *Bull Exp Biol Med*. 2013. Vol. 154, N 4. P. 501–504. doi: 10.1007/s10517-013-1987-6
4. Хавинсон В.Х., Линькова Н.С., Кветной И.М., и др. Тималин: активация дифференцировки гемопоэтических стволовых клеток человека // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2020. № 3. С. 158–163. EDN: WRYRRT doi: 10.47056/1814-3490-2020-3-158-163
5. Севостьянова Н.Н., Линькова Н.С., Полякова В.О., и др. Иммуномодулирующее действие вилона и его аналога в культурах клеток тимуса человека и животных // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2012. № 4. С. 220–223. EDN: PIBJON

Михайлова Н.А. ✉, Кольцова А.М., Хотин М.Г.

Российская коллекция типовых клеточных культур (RTCC) — биоресурсный центр для обеспечения фундаментальных и прикладных исследований в Российской Федерации

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ natmik@mail.ru

Аннотация. Обосновывается необходимость создания биоресурсного центра «Российская коллекция типовых клеточных культур» для обеспечения национальной технологической независимости РФ. Коллекция обеспечит подтверждение и контроль идентичности и чистоты исследовательских культур, стандартизацию процессов.

Ключевые слова: коллекции клеточных культур; национальная коллекция; аутентификация клеток; стандарты для клеточных линий и процессов культивирования и хранения; биоресурсный центр.

Mikhailova N.A., Koltsova A.M., Khotin M.G.

Russian Type Cell Cultures Collection (RTCC) — bioresource center for providing fundamental and applied research in the Russian Federation

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The necessity of creating a bioresource center “Russian Type Cell Cultures Collection” is substantiated to ensure national technological independence of the Russian Federation. The collection will ensure control of the identity and purity of research cultures, standardization of processes.

Keywords: cell culture collections; national collection; cell authentication; standards for cell lines and processes for culturing and storage; bioresource center.

В современном мире биоресурсные коллекции клеток человека и животных играют важную роль в технологическом развитии стран, определяя приоритеты в таких высокотехнологичных направлениях как биомедицина, биотехнология, фармацевтика, создание клеточных и генетических технологий, а также способствуют развитию новых междисциплинарных исследований. Крупнейшие зарубежные коллекции (американская ATCC, европейская ECACC и др.) насчитывают тысячи эталонных клеточных линий и являются центрами их распространения, наряду с другими стандартизованными материалами для научных и прикладных исследований и разработок.

В настоящее время в Российской Федерации существует небольшое число коллекций клеточных культур, функционирующих как ЦКП или УНУ (<https://ckp-rf.ru/>), однако эффективность их работы остается низкой в связи с недостаточной финансовой поддержкой и дефицитом кадров соответствующей квалификации.

Создание Российской коллекции типовых клеточных культур (RTCC) для обеспечения национальной технологической независимости и биобезопасности Российской Федерации — актуальная и значимая задача для страны. Результаты, которые получают с использованием клеточных культур и клеточных линий, определяют вектор научно-технологического развития страны в области фармакологии, биотехнологии и биомедицины. На основе типовых клеточных линий человека и животных и *in vitro* моделей изучаются механизмы, лежащие в основе патологических изменений в клетках при различных заболеваниях, производится поиск новых лекарственных препаратов, создаются вакцины, проводятся доклинические исследования и многое другое.

Основные функции национальной коллекции типовых клеточных культур состоят в аутентификации клеток для подтверждения их идентичности и чистоты исследовательских культур, включая регулярный контроль на отсутствие контаминации, а также стандартизация процессов получения клеточных линий, культивирования, хранения и передачи образцов пользователям.

При поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-1063) в 2021–2024 гг., на базе «Коллекции культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН и принципах сетевого взаимодействия, объединились 4 коллекции общебиологического и биомедицинского назначения, держателями которых являются ИНЦ РАН, ИБР РАН, ИЦИГ СО РАН и ООО «Покровский банк стволовых клеток» (сайт сетевой коллекции <http://cellcollection.ru>) и создана Российская коллекция типовых клеточных культур (РКТКК или RTCC). Создан консорциум, объединивший организации-держатели коллекций, разработаны Положение и регламент работы RTCC. Данные документы определяют базовые принципы организации сетевого объединения коллекций сходного типа (культур клеток человека и животных), фонды которых доступны для заказа стандартных образцов сторонними организациями.

Перспективная цель — на единой информационной платформе RTCC объединить ресурсы имеющихся в РФ коллекций клеточных культур, образцы которых будут доступны заказчикам. Значение такой коллекции состоит в расширении фондов отечественных образцов, повышении их качества, доступности для пользователей.

Российская коллекция типовых клеточных культур (RTCC) должна стать биоресурсным центром для обеспечения высокого уровня проводимых в стране фундаментальных научных и прикладных исследований, выполнения проектов, реализации образовательных программ и подготовки высококвалифицированных кадров, дефицит которых так остро ощущается в настоящее время.

Михайлов В.М.¹ ✉, Фирсанов Ю.В.², Фадеева С.Э.², Веженкова И.В.¹, Михайлова Е.В.¹,
Соколова А.В.¹, Мамаева Г.И.³

Влияние НАДФ на выживание клеток и репарацию ДНК кардиомицитов мышей mdx после термодинамического стресса

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Городская больница № 31, Санкт-Петербург, Россия

✉ vmikhailov@incras.ru

Аннотация. Представлены результаты влияния НАДФ на выживание кардиомицитов мышей mdx после 5 мин плавания при 120 °С (термодинамический стресс, ТДС). После ТДС мышам вводили НАДФ в дозе 0,7 г/кг. Мышей изучали через 1 и 24 ч. Заключено, что НАДФ останавливает гибель клеток при участии гистона γ -H2AX.

Ключевые слова: мыши mdx; термодинамический стресс; НАДФ; гибель клеток.

Mikhailov V.M.¹, Firsanov J.V.², Fadeeva S.E.², Vezhenkova I.V.¹, Mikhailova E.V.¹,
Sokolova A.V.¹, Mamaeva G.I.³

NADP influence for cell survival and DNA reparation of mdx mice cardiomyocytes after termodynamic stress

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

³ City Hospital No. 31, Saint Petersburg, Russia

Abstract. There are results of NADP influence for cardiomyocytes mdx mice survival after 5 min swimming at 120 °С (termodynamic stress TDS). After TDS mice were injected with NADP in dose 0.7 g/kg. Mices were studied after 1 and 24 h after TDS. Results are that NADP stop cell dearth with particpance of histone γ -H2AX.

Keywords: mdx mice; termodynamic stress; NADP; cell death up to 10 words.

Миокард мышей mdx является моделью для изучения выживания кардиомиоцитов и репарации ДНК из-за окислительного стресса, характерного для мышей mdx. При электрокардиографии было установлено, что внутрибрюшинное введение НАДФ мышам mdx в дозе 700 мг/кг восстанавливает реполяризацию зубца Т, удлиняет интервал QT и уменьшает частоту сердечных сокращений. В работе представлены результаты действия НАДФ на выживание и репарацию ДНК кардиомиоцитов мышей mdx. Контролем служили сердца мышей C57BL/6. Опыты выполнялись на мышах-самцах 2- и 6-месячного возраста. Повреждающим действием было 5 мин плавание при температуре воды 12°С (термодинамический стресс, ТДС). При этих условиях мыши не погибали. Сразу после ТДС мышам внутрибрюшинно вводили НАДФ в дозе 700 мг/кг веса. Животных вскрывали через 24 ч. Левые желудочки сердец изучали на криостатных срезах после окрашивания моноклональными антителами к α -саркомерному актину (Sigma) в разведении 1:100. Вторичным антителами были антитела к IgG, меченные биотином. Стрептоавидин, меченный FITC, был использован как непосредственная метка. Ядра докрашивали пропидий иодидом и заключали в глицерин. Двунитевые разрывы ДНК (ДрДНК) выявляли при помощи поликлональных антител к терминальному пептиду гистона γ -H2AX (Stressgene, USA). Окраску выполняли при помощи антител, меченных пероксидазой. Счет клеток делали на конфокальном микроскопе Leica LSM V Pascal с лазерами 532 и 488. Обнаружено, что ТДС уменьшил количество кардиомиоцитов мышей C57BL/6 от $(81,0 \pm 6) \times 10^3$ до $(46,1 \pm 5) \times 10^3$ клеток/мм³; у молодых мышей

mdx (2 мес.) от $(83,2 \pm 7) \times 10^3$ до $(55,1 \pm 7) \times 10^3$ кл/мм³ и у пожилых мышей mdx от $(75,0 \pm 9) \times 10^3$ клеток/мм³ до $(40,0 \pm 6) \times 10^3$ кл/мм³. Подсчитывали количество меченых кардиомиоцитов и немышечных клеток. После ТДС совместно с введением НАДФ количество кардиомиоцитов сохранялось на начальном уровне. Таким образом, НАДФ, введенный внутривентриально сразу после ТДС, оказал антиапоптотическое действие на жизнь клеток миокарда. Представляет интерес как НАДФ после ТДС влияет на образование двуни-тевых разрывов ДНК (ДрДНК) и на их репарацию. Необходимо учитывать что ДрДНК, обнаруживаемые в кардиомиоцитах после холодного плавания на 2 месяце жизни присутствуют в ДНК из-за окислительного стресса, присущего мышам mdx с раннего возраста. ТДС только увеличивает их количество. Образование ДрДНК после рентгеновского облучения (РО) мышей имеет взрывной характер. Общепринято, что гистоны γ -H2AX накапливаются в ядрах кардиомиоцитов около ДрДНК в первые 20 мин после РО в доле 20–30%. Через 24 ч доля репарированных ДрДНК уменьшается на 25%. Полная репарации ДрДНК должна сопровождаться исчезновением гистона γ -H2AX из места локализации. У мышей mdx после ТДС доля γ -H2AX(+) кардиомиоцитов через 1 ч достигает 45%, Через 24 ч эта доля уменьшается до 5,1%. Обычно количество меченых кардиомиоцитов превышало количество немышечных клеток в 5 раз раз. Сравнение величины потери клеток после ТДС и доли γ -H2AX, имеющих в клетках миокарда через 1 ч после ТДС, указывают на репарацию ДНК, как одного из молекулярных механизмов выживания кардиомиоцитов после ТДС. Наиболее эффективно репарация ДНК осуществляется у молодых мышей. С возрастом увеличивается доля γ -H2AX(+) кардиомиоцитов, накапливающихся в миокарде через 24 ч после ТДС.

Мичурина С.С.¹✉, Стафеев Ю.С.¹, Агарёва М.Ю.^{1,2}, Белоглазова И.Б.¹, Парфёнова Е.В.^{1,2}

Активация экспрессии креатинкиназы В и глицеролкиназы для создания термогенных адипоцитов

¹ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова, Москва, Россия

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

✉ michurinas192@gmail.com

Аннотация. Термогенез в жировой ткани — это энергозатратный процесс, предотвращающий развитие ожирения и гипергликемии. Мы показали, что гиперэкспрессия креатинкиназы В и глицеролкиназы стимулирует термогенез и поглощение глюкозы в адипоцитах, подтверждая важную роль ферментов футильных циклов в метаболизме.

Ключевые слова: термогенез; креатинкиназа В; глицеролкиназа; адипоциты.

Michurina S.S.¹, Stafeev Yu.S.¹, Agareva M.Yu.^{1,2}, Beloglazova I.B.¹, Parfyonova Ye.V.^{1,2}

Activation of creatine kinase B and glycerol kinase expression to generate thermogenic adipocytes

¹ National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Thermogenesis in adipose tissue is an energy consuming process promoting metabolic health. We show that overexpression of creatine kinase B and glycerol kinase elevates thermogenesis and glucose consumption in adipocytes, confirming the significant role of futile cycles' enzymes in metabolism.

Keywords: thermogenesis; creatine kinase B; glycerol kinase; adipocytes.

Термогенез в жировой ткани — это процесс, при котором энергия, полученная в результате окисления глюкозы, жирных кислот и других субстратов, рассеивается в виде тепла. Благодаря стимуляции катаболизма термогенез сопровождается анорексигенным и гипогликемическим эффектами и является перспективной мишенью для разработки новых подходов к терапии ожирения, сахарного диабета 2 типа и сопутствующих метаболических патологий. Современные исследования термогенеза в жировых клетках показали, что для диссипации избыточной энергии могут активироваться термогенные футильные циклы (креатинкиназный, триглицеридный и др.), которые увеличивают потребность клеток в АТФ, и как следствие, усиливают окислительные процессы. В настоящей работе мы активировали экспрессию ключевых ферментов футильных циклов: глицеролкиназы (ГК) и креатинкиназы В (СКВ), с целью получения термогенных адипоцитов с повышенной активностью окисления глюкозы.

Для активации экспрессии ГК и СКВ были использованы лентивирусные конструкции, кодирующие последовательности мРНК NM_008194.3 (ГК), NM_021273.4 (СКВ). Клетки культуры 3T3-L1 дифференцировали в адипоциты при стимуляции инсулином, изобутилметилксантином, дексаметазоном и розиглитазоном. Зрелые адипоциты трансдуцировали и через 48 ч оценивали изменение экспрессии целевых белков методами ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга. В адипоцитах с повышенной экспрессией ГК и СКВ оценивали активность поглощения глюкозы и липогенеза с использованием радиоактивно меченных препаратов [³H]-2-дезоксиглюкозы и [¹⁴C]-глюкозы. Метаболизм глюкозы исследовали в базальном состоянии и при стимуляции инсулином и норадреналином. Для изучения термогенеза, изменения мембранного потенциала митохондрий и накопления липидов в модифицированных адипоцитах применяли прижизненную

визуализацию клеток с помощью флуоресцентных зондов ERthermAC, JC-1 и BODIPY493/503 и конфокальной микроскопии.

Были получены генетические конструкции, увеличивающие экспрессию СКВ и ГК в зрелых адипоцитах в 10 и 2 раза, соответственно. Обнаружено, что гиперэкспрессия ГК способствует увеличению поглощения глюкозы в базальном состоянии и при стимуляции норадреналином, а также снижает синтез жирных кислот. Активация поглощения глюкозы при гиперэкспрессии ГК сопровождается стимуляцией термогенеза и увеличением мембранного потенциала митохондрий. В адипоцитах с повышенной экспрессией СКВ изменение энергетического метаболизма было менее выражено, но также наблюдалось увеличение амплитуды метаболического ответа на норадреналин. Кроме того, было показано, что повышение экспрессии белков СКВ и ГК в адипоцитах ассоциировано с уменьшением количества мелких и средних липидных капель за счет увеличения экспрессии активатора слияния капель — белка FSP27.

В заключение, в адипоцитах с повышенной экспрессией СКВ и ГК наблюдали значительные изменения энергетического метаболизма и чувствительности к норадреналину, но не инсулину. Активация экспрессии ключевых ферментов креатинкиназного и триацилглицеридного футильных циклов позволяет получить адипоциты, демонстрирующие более сильный метаболический ответ на норадреналин, который обеспечивает усиление окисления глюкозы и термогенеза. Повышение мембранного потенциала митохондрий в модифицированных клетках может быть следствием увеличения потребности клеток в АТФ, так как активность футильных циклов сопряжена с расходом энергии. Таким образом, активация СКВ и ГК может быть использована для стимуляции термогенеза и утилизации глюкозы в адипоцитах при разработке терапевтических подходов для борьбы с ожирением и сопутствующими метаболическими заболеваниями.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-75-10085.

Молдавский Д.В. ✉, Лузина Е.А., Кадырова А.С., Гилязиева З.Е., Ризванов А.А., Соловьева В.В.

Исследование влияния везикул мезенхимных стволовых клеток на ксенографтной модели опухоли молочной железы

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

✉ daniilmoldavskiy2@gmail.com

Аннотация. Внеклеточные везикулы играют важную роль в развитии лекарственной резистентности и росте злокачественных опухолей. В данной работе исследовалось влияние везикул мезенхимных стволовых клеток на лекарственную резистентность и пролиферацию опухолевых клеток на модели ксенографта опухоли молочной железы.

Ключевые слова: опухолевые сфероиды; ксенографт; иммунодефицитные мыши; аденокарцинома молочной железы; мезенхимные стволовые клетки; внеклеточные везикулы; цитохалазин В.

Moldavskii D.V., Luzina E.A., Kadyrova A.S., Gilazieva Z.E., Rizvanov A.A., Solovyova V.V.

Study of the xenograft model of breast cancer to evaluate mesenchymal stem cell vesicles influence

Kazan Federal University, Institution of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russia

Abstract. Extracellular vesicles play an important role in the development of multidrug resistance and malignant tumor growth. In this study, we investigated the influence of mesenchymal stem cell vesicles on drug resistance and tumor cell proliferation on a breast cancer xenograft model.

Keywords: tumor spheroids; xenograft; immunodeficient mice; breast adenocarcinoma; mesenchymal stem cells; extracellular vesicles; cytochalasin B.

Внеклеточные везикулы — это мембранные структуры, которые выделяются различными типами клеток. Они играют важную роль в развитии множественной лекарственной резистентности, а также в росте злокачественных опухолей. Этот эффект обусловлен тем, что везикулы могут переносить различные функциональные молекулы, способствующие приобретению опухолевыми клетками резистентности к лекарственным препаратам. Для оценки влияния везикул на лекарственную резистентность и пролиферативную активность опухолевых клеток необходимо создать модель, которая отражала бы биологические особенности опухоли. Поэтому целью данной работы является определить влияние внеклеточных везикул мезенхимных стволовых клеток на ксенографтной модели аденокарциномы молочной железы. Для создания опухолевых сфероидов в суспензии использовались клетки аденокарциномы молочной железы (MCF-7). Для выделения везикул с помощью 10 мкг/мл цитохалазина В были использованы МСК жировой ткани. Везикулы были добавлены к опухолевым сфероидам в концентрации 50 мкг/мл. Далее сфероиды были смешаны с матригелем и подкожно введены иммунодефицитным мышам, которым была проведена противоопухолевая терапия цисплатином (CDDP). После терапии влияние везикул на полученные ксенографты изучали с помощью гистологического анализа и ПЦР-РВ. С помощью гистологического анализа было показано, что у ткани имеются более плотные и рыхлые участки. После противоопухолевой терапии уровень некроза ткани был выше в обеих опытных группах. Однако достоверная разница между группами отсутствовала. Оценка уровня мРНК генов производилась с помощью ПЦР-РВ, так было выявлено, что при добавлении везикул МСК происходило увеличение содержания мРНК генов *OCT4* в 2,4 раза, *SOX2* в 2,6 раза, *NANOG* в 2,04 раза

по сравнению с контрольной группой. Также в группе с терапией CDDP после добавления везикул МСК наблюдалось увеличение содержания мРНК генов *OCT4* в 2,5 раза, *SOX2* в 2,1 раза, *NANOG* в 2,25 раза по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, была получена ксенографтная модель опухоли из сфероидов аденокарциномы молочной железы, которую можно использовать для изучения влияния везикул.

Работа выполнена за счет средств Российского научного фонда (грант № 21-74-10021).

Молодцова Д.В.^{1,2} ✉, Осипов А.Н.^{1,2}

Мезенхимальные стволовые клетки и онкологические заболевания: за и против

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики имени Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва, Россия

² Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна, Москва, Россия

✉ dmolodtsova@gmail.com

Аннотация. На фоне внедрения клеточной терапии с использованием МСК для лечения аутоиммунных заболеваний и для регенерации тканей также рассматривается возможность их применения для лечения онкологических заболеваний. Целью данной работы являлась оценка влияния МСК на клетки немелкоклеточного рака легкого.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; немелкоклеточный рак легкого; сокультивирование; двунитевые разрывы ДНК; лучевая терапия.

Molodtsova D.V.^{1,2}, Osipov A.N.^{1,2}

Mesenchymal stem cells and cancer: pro and contra

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. With the introduction of MSC-based cell therapy for the treatment of autoimmune diseases and tissue regeneration, the possibility of the use of MSCs in the treatment of oncological diseases is also being considered. The aim of this work was to study the effects of MSCs on NSCLC cells.

Keywords: mesenchymal stem cells; non-small cell lung cancer; co-cultivation; DNA double-strand breaks; radiation therapy.

Клеточная терапия стала прорывом в лечении злокачественных новообразований и открыла эру нового человека, когда клетки пациента берутся, модифицируются и вводятся обратно полностью вооруженными, чтобы элиминировать опухолевые клетки самостоятельно или в сочетании с противоопухолевой терапией. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) привлекли внимание как перспективные противоопухолевые агенты. Однако амбивалентная природа взаимодействия МСК и опухолевых клеток может создавать потенциальную опасность при введении МСК в микросреду опухоли и необходимо подробнее изучить влияние МСК из различных источников на разные виды опухолей [1]. Целью настоящего исследования была оценка влияния сокультивирования с МСК человека на эффективность репарации двунитевых разрывов (ДР) ДНК в клетках немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) человека, подвергшихся воздействию рентгеновского излучения. Дополнительно также исследовали влияние сокультивирования на пролиферативную активность необлученных НМРЛ. Для оценки эффективности репарации ДР ДНК проводили анализ количественного выхода остаточных фокусов белков-маркеров ДР (γH2AX и 53BP1) через 24 ч после облучения в дозах 2, 4 и 6 Гр. Результаты исследования показали, что сокультивирование с МСК не влияет на эффективность репарации ДР ДНК, индуцированных рентгеновским излучением, а также на пролиферативную активность клеток НМРЛ [2]. Дальнейшие исследования влияния МСК на опухолевые клетки необходимы для понимания

их молекулярно-клеточных взаимодействий для развития новых подходов терапии онкологических заболеваний.

Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 23-14-00078).

Список литературы

1. Molodtsova D.V., Osipov A.N. Mesenchymal stem cells and cancer: pro and contra // Cancer Invest. 2024. (in print)
2. Молодцова Д.В., Осипов А.Н. Сокультивирование с мезенхимальными стволовыми клетками не влияет на эффективность репарации двуниевых разрывов ДНК в облученных клетках немелкоклеточного рака легкого человека // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2024. (в печати).

Монакова А.О.^{1,2} ✉, Басалова Н.А.^{1,2}, Попов В.С.^{1,2}, Мангушева В.А.², Балабаньян В.Ю.¹, Ефименко А.Ю.^{1,2}

Тканеспецифичность мезенхимных стромальных клеток в регуляции ниши сперматогониальных стволовых клеток

¹ Центр регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, Медицинский научно-образовательный институт, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ monakova-anya@mail.ru

Аннотация. При сильных повреждениях нарушается способность ниши сперматогониальной стволовой клетки (ССК) к регенерации. Показана роль мезенхимных стромальных клеток (МСК) в восстановлении строения и функции ниши ССК, а также зависимость эффектов от источника получения и повреждения экзогенных МСК.

Ключевые слова: ниша; мезенхимные стромальные клетки; сперматогониальная стволовая клетка; тканеспецифичность; секретом; клетки Лейдига; фактор роста эндотелия сосудов.

Monakova A.O.^{1,2}, Basalova N.A.^{1,2}, Popov V.S.^{1,2}, Mangusheva V.A.², Balabanyan V.Yu.¹, Efimenko A.Yu.^{1,2}

Tissue-specific effects of mesenchymal stromal cells in damaged niche of spermatogonial stem cell

¹ Centre for Regenerative Medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of medicine, Medical Research and Educational Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Under severe damage, the regenerative ability of the spermatogonial stem cell (SSC) niche is impaired. The role of mesenchymal stromal cells (MSC) in restoring the structure and function of the SSC niche is shown, as well as the dependence of the effects on the source and quality of exogenous MSC.

Keywords: niche; mesenchymal stromal cells; spermatogonial stem cell; tissue-specific effects; secretome; Leydig cells; vascular endothelial growth factor.

Выживаемость, пролиферация и дифференцировка стволовых клеток регулируется специфическим микроокружением — нишей, основу которой составляют поддерживающие клетки, внеклеточный матрикс, растворимые факторы клеточной секреции. При сильных повреждениях ниши стволовой клетки нарушается процесс регенерации ткани. Таким образом, для успешного восстановления структуры и функции ткани, в первую очередь, необходимо восстановление ниши. Ранее было показано, что важная роль в регенерации ниши принадлежит мезенхимным стромальным клеткам (МСК), которые присутствуют во всех нишах стволовых клеток и оказывают эффекты преимущественно за счёт секреции комплекса паракринных факторов — секретомы. Введение секретомы МСК грызунам под белочную оболочку яичка в моделях повреждения сперматогенеза способствовало восстановлению ниши сперматогониальной стволовой клетки (ССК) и, как следствие, фертильности [1]. Однако регенераторная способность резидентных МСК в нише ССК до сих пор остаётся малоизученной. В связи с этим, стоит вопрос о целесообразности введения экзогенного секретомы МСК, а также о выборе источника МСК.

В рамках данного исследования у мышей было смоделировано химиотерапевтическое повреждение сперматогенеза путём внутрибрюшинных инъекций доксорубина в концентрации 1 мг/кг раз в два дня до достижения суммарной дозы 10 мг/кг. Часть семенников интактных мышей и мышей с повреждением сперматогенеза анализировали с помощью иммуногистохимического окрашивания на один из основных

маркёров МСК — CD90. Из других семенников выделяли фракции CD90⁺ клеток и клетки Лейдига. Также были выделены МСК из подкожной жировой ткани мыши и человека и из пульпы зуба человека. Собирали образцы секретома МСК из перечисленных источников и CD90⁺ клеток семенников мыши и добавляли к клеткам Лейдига из интактных или повреждённых семенников. На 4 день собирали среду с клеток Лейдига и затем измеряли концентрацию тестостерона методом иммуноферментного анализа (ИФА). Параллельно в полученных образцах секретома МСК из разных источников методом ИФА измеряли количество фактора роста эндотелия сосудов (VEGF).

С помощью иммуногистохимического анализа было показано, что введение доксорубина приводит к повреждению ниши ССК, сопровождающегося увеличением количества CD90⁺ клеток в интерстициальном пространстве. При экзогенном введении секретома МСК человека из жировой ткани число CD90⁺ клеток увеличивается ещё больше, что может указывать на возможный компенсаторный вклад CD90⁺ клеток в регенерацию ниши ССК. Однако в *in vitro* модели на клетках Лейдига было показано, что секретом CD90⁺ клеток из повреждённых семенников слабее стимулирует клетки Лейдига как интактных, так и повреждённых семенников, по сравнению с секретом CD90⁺ клеток из интактных яичек. Полученные данные указывают на то, что CD90⁺ клетки из повреждённой ниши ССК, по-видимому, имеют существенно сниженный регенераторный потенциал. Кроме того, секретом МСК из жировой ткани мыши оказывал ещё меньший стимулирующий эффект на клетки Лейдига, по сравнению с секретом CD90⁺ МСК, выделенных из семенников, что может свидетельствовать о тканеспецифичности этого эффекта МСК. В связи с тем, что регенераторной способности CD90⁺ клеток из повреждённых семенников недостаточно для восстановления ниши ССК, экзогенное введение секретома МСК из неповреждённых источников может быть перспективным подходом для терапии нарушений сперматогенеза. Добавление секретома МСК жировой ткани и пульпы как одних из наиболее доступных источников МСК человека приводило к значимой стимуляции продукции тестостерона интактными клетками Лейдига, причем эффекты клеток из разных источников были сравнимы. При этом концентрация VEGF, одного из самых представленных факторов роста в составе секретома МСК, была сопоставима в секрете МСК жировой ткани и пульпы зуба человека и напрямую коррелировала с стимулирующим эффектом на клетки Лейдига.

Таким образом, МСК, по-видимому, важны для восстановления ниши ССК, при этом их свойства тканеспецифичны. Однако при повреждении регенераторные свойства резидентных МСК снижаются. В свою очередь, экзогенное введение секретома МСК из интактных источников — жировой ткани и пульпы зуба человека восстанавливает секреторную активность тестостерона поддерживающими нишу клетками Лейдига. Увеличение секреции тестостерона клетками Лейдига напрямую коррелирует с содержанием VEGF в секрете МСК, что позволяет считать VEGF возможным предиктором эффекта секретома МСК на клетках Лейдига. Полученные результаты подтверждают тканеспецифичные свойства секретома МСК, а также перспективность введения экзогенного секретома МСК в качестве биомиметического подхода при заболеваниях, связанных с повреждением ниши ССК. Установленные эффекты на клетках Лейдига позволяют разработать подходы к стандартизации препарата на основе секретома МСК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>

Список литературы

1. Monakova A., Sagaradze G., Basalova N., et al. Novel potency assay for MSC secretome-based treatment of idiopathic male infertility employed Leydig cells and revealed vascular endothelial growth factor as a promising potency marker // *Int J Molec Sci*. 2022. Vol. 23, N 16. P. 9414. doi: 10.3390/ijms23169414

Морозова К.Н.^{1,2}, Вольф Е.Р.², Смирнов А.В.¹, Киселева Е.В.¹, Пристяжнюк И.Е.¹ ✉

Ультраструктурные нарушения в клетках-производных HEK293, несущих биаллельные мутации в гене *COH1*, ассоциированном с синдромом Коэна

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ iprist@bionet.nsc.ru

Аннотация. Синдром Коэна — орфанное заболевание, вызванное компаунд-гетерозиготными мутациями в гене *COH1*, характеризующееся задержкой роста и умственного развития. Линии клеток HEK293 с гомозиготными мутациями в гене *COH1* демонстрируют нарушения внутриклеточной организации, характерные для клеток пациентов.

Ключевые слова: *COH1*; синдром Коэна; VPS13B; клеточные модели заболеваний; ультраструктура клеток; аппарат Гольджи; HEK293; электронная микроскопия; патогенез заболеваний.

Morozova K.N.^{1,2}, Wolf E.R.², Smirnov A.V.¹, Kiseleva E.V.¹, Pristyazhnyuk I.E.¹

Ultrastructural Abnormalities in HEK293 — derived cell lines with biallel mutations in *COH1* gene associated with Cohen syndrome

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Abstract. Cohen syndrome is an orphan disease, characterized by growth and mental retardation. It is caused by compound heterozygous mutations in the *COH1* gene. HEK293 cell lines with homozygous mutations in the *COH1* gene exhibit intracellular abnormalities similar to those found in patient's cells.

Keywords: *COH1*; Cohen syndrome; VPS13B; cellular models of diseases; cell ultrastructure; Golgi apparatus; HEK293; electron microscopy; pathogenesis of diseases.

Синдром Коэна (СК) — это малоизученное орфанное заболевание с выраженными нейрональными проявлениями, такими как умственная и физическая отсталость, микроцефалия и прогрессирующая дегенерация клеток сетчатки. СК вызван сложными гетерозиготными мутациями в гене *COH1* (*VPS13B*), кодирующем гигантский белок *COH1* (*VPS13B*) [1]. Он принадлежит к семейству белков *VPS13*, объединенных наличием общих консервативных доменов, наиболее выдающимся из которых является длинный гидрофобный желоб, через который липиды транспортируются между мембранами клеточных органелл [2]. *VPS13B* — интегральный мембранный белок, локализующийся на аппарате Гольджи (АГ) и регулирующий его структуру и функцию, что имеет решающее значение для формирования нейронов [3], а также влияет на внутриклеточный везикулярный транспорт. В нашей предыдущей работе с помощью просвечивающей электронной микроскопии мы обнаружили наличие множественных ультраструктурных изменений в нейрональных клетках пациентов с синдромом Коэна, таких как нарушение структуры органелл: фрагментация АГ и расширение его цистерн, стресс эндоплазматического ретикулума, нарушение структуры мембран и крист митохондрий, накопление крупных аутофагосом с непереваренным содержимым [4]. Как известно, эти симптомы связаны с повышенным клеточным стрессом и потенциальной нейродегенерацией. Однако различия в генотипе пациентов с СК и здоровых доноров усложняет экспертизу выявленных изменений.

Для исследования изменений в клетках, связанных с мутациями в гене *COH1*, мы получили несколько линий на основе клеток Phoenix (HEK293) с использованием системы редактирования генома CRISPR/Cas9. Было получено три линии клеток с нарушенной структурой гена в области, кодирующей N-конец (87H) и C-конец (37D и 120D) домена, образующего гидрофобный желоб. Иммуноцитохимический анализ полученных линий выявил повышенное количество клеток с фрагментированным АГ по сравнению с клетками Phoenix, а электронно-микроскопическое исследование подтвердило нарушение структуры АГ, а именно выявило наличие фрагментированных и раздутых цистерн АГ. Кроме того, были обнаружены субклеточные изменения, сходные с нарушениями, выявленными ранее в нейральных стволовых клетках пациентов с СК [4]: накопление аутолизосом с непереваренным мембранным содержимым, нарушение структуры митохондрий, увеличение мембранных контактов. Также в цитоплазме некоторых клеток наблюдается наличие аномальных включений фибриллярного материала.

Таким образом, исследование изогенных клеточных линий Phoenix с внесенными мутациями в гене *COH1* позволит не только создать детальное описание внутриклеточных изменений, лежащих в основе патологии СК, но и получить новые фундаментальные данные о роли белка COH1 в клетке, функциональной роли его доменов, а также предложить основные мишени для лечения этого заболевания.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1063). Конфокальная микроскопия и ТЭМ выполнены в Центре коллективного пользования микроскопического анализа биологических объектов (ИЦИГ СО РАН, г. Новосибирск, Россия) в рамках государственного проекта № FWNR-2022-0019.

Список литературы

1. Seifert W., Holder-Espinasse M., Kühnisch J., et al. Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of COH1 // *Hum Mutat.* 2009. Vol. 30, N 2. P. E404–420. doi: 10.1002/humu.20886
2. McEwan D.G., Ryan K.M. ATG2 and VPS13 proteins: molecular highways transporting lipids to drive membrane expansion and organelle communication // *FEBS J.* 2022 Vol. 289, N 22. P. 7113–7127. doi: 10.1111/febs.16280
3. Seifert W., Kühnisch J., Maritzen T., et al. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the golgi complex and directs neurite outgrowth // *J Biol Chem.* 2015. Vol. 290, N 6. P. 3349–3358. doi: 10.1074/jbc.M114.608174
4. Shnaider T.A., Khabarova A.A., Morozova K.N., et al. Ultrastructural abnormalities in induced pluripotent stem cell-derived neural stem cells and neurons of two Cohen syndrome patients // *Cells.* 2023. Vol. 12, N 23. P. 2702. doi: 10.3390/cells12232702

Морозова Я.В.^{1,2} ✉, Радаев С.М.², Емелина Д.А.³

Системное применение плазмы пуповинной крови человека у детей с расстройствами аутистического спектра (АСД) в сочетании с эпилепсией

¹ НМИЦ кардиологии им. акад. Е.И. Чазова МЗ РФ, Москва, Россия

² ГБУЗ НИИ СП им. Н.В. Склифосовского ДЗМ, Москва, Россия

³ НМИЦ психиатрии и неврологии им. В.М. Бехтерева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

✉ yanamorozova0@gmail.com

Аннотация. Резус- и группосовместимую плазму пуповинной крови вводили 16 пациентам с РАС и эпилептическими приступами. Клиническое наблюдение и анализ опросников показали снижение частоты эпилептических приступов более чем на 50% через 6 месяцев после начала терапии, а также снижение тяжести аутистической симптоматики.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра; эпилепсия; интеллектуальные функции; плазма пуповинной крови.

Morozova Ya.V.^{1,2}, Radaev S.M.², Yemelina D.A.³

Systemic administration of human umbilical cord blood plasma in children with autism spectrum disorders (ASD) combined with epilepsy

¹ Federal State Budgetary Institution National Medical Research Centre of Cardiology Named after Academician E.I. Chazov of the Russian Federation Ministry of Health, Moscow, Russia

² Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russia

³ Federal State Budgetary Institution V.M. Bekhterev National Research Medical Center for Psychiatry and Neurology of the Russian Federation Ministry of Health, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Group- and Rh-compatible cord blood plasma was administered to 16 patients with ASD and epileptic seizures. Clinical observation and analysis of questionnaires showed a decrease in the frequency of epileptic seizures by more than 50 percent 6 months after the start of therapy, as well as a decrease in the severity of autistic symptoms.

Keywords: autism spectrum disorders; epilepsy; intellectual functions; umbilical cord-placental blood plasma.

На сегодняшний день основные методы лечения детского аутизма можно условно разделить на психокоррекционные и лекарственные, однако медикаментозная терапия направлена на сопутствующую симптоматику и эффективность ее в отношении основных проявлений остается невысокой. Эпилептические приступы фиксируются примерно у 20–30% детей с РАС, при этом чаще встречаются среди пациентов со сниженными интеллектуальными способностями [1]. Вероятнее всего взаимосвязь аутизма и эпилепсии кроется в ранних поражениях ЦНС и генетических нарушениях, где эпилептогенез может приводить к нарушениям психического развития и аутистическому поведению. Существует мнение, что эпилептические приступы у пациентов с РАС труднее поддаются фармакотерапии [2], и назначение противосудорожной терапии при РАС не приводит к достоверному снижению частоты приступов [3].

Многочисленные исследования, проведенные нами [4] и нашими коллегами, отмечают, что вероятным вариантом успешного лечения таких расстройств станет клеточная терапия с использованием стволовых клеток пуповинной крови. Основываясь на полученных ранее результатах и принимая во внимание,

что продукты имеют один источник, мы предположили, что плазма пуповинной крови (ППК), обогащенная пулом нейротрофических факторов, может оказывать схожие терапевтические эффекты.

Стандартизованный препарат содержит активные компоненты очищенной плазмы пуповинной крови [5]: производные тромбоцитов (микровезикулы с активными пептидами), биологически активные белки (альбумин, иммуноглобулины, факторы роста, цитокины и т.п.), которые способны оказывать стимулирующее действие на нейро- и ангиогенез в головном мозге.

Цель. Оценка влияния плазмы пуповинной крови человека на показатели когнитивных функций и контактности у детей с РАС и эпилепсией.

Материалы и методы. Группу составили 16 пациентов (10 мальчиков, 6 девочек, средний возраст $6,5 \pm 1,5$ года) с РАС и эпилептическими приступами. Группо- и резус-совместимую плазму пуповинно-плацентарной крови вводили внутривенно струйно в разовой дозе 20 мл, шестикратно с интервалом 7 ± 1 суток между введениями. Динамика состояния пациентов оценивалась с помощью опросников Checklist for autism spectrum disorders (CASD), Autism treatment evaluation checklist (ATEC) и фиксацией количества приступов.

Результаты. Применение плазмы пуповинно-плацентарной плазмы характеризовалось хорошей переносимостью и отсутствием нежелательных побочных явлений. Клиническое наблюдение и анализ опросников показали уменьшение выраженности аутистических симптомов у пациентов экспериментальной группы через 3 и 6 месяцев после начала терапии. Выявлена положительная динамика в виде развития восприятия, снижения соматосенсорных нарушений, отмечен положительный эффект в сфере речевых функций, облегчение и ускорение процесса обучения.

Наряду с улучшениями в когнитивном функционировании зафиксировано снижение лабильности в психоэмоциональной сфере, уменьшение выраженности агрессивного (аутоагрессивного) поведения и возбудимости. У большинства больных регистрируется улучшение в сфере самообслуживания и освоения гигиенических навыков, возрос уровень социальной адаптации и коммуникативных способностей. Удалось зафиксировать уменьшение частоты приступов более чем на 50 процентов через 6 месяцев от начала терапии.

Выводы. Полученные положительные результаты применения плазмы пуповинно-плацентарной крови у детей с аутизмом в сочетании с эпилепсией позволяют сделать вывод, что данный метод может быть использован в терапии и реабилитации пациентов детского возраста с РАС и эпилепсией.

К недостаткам данного исследования следует отнести малую группу пациентов, отсутствие группы сравнения. К преимуществам метода помимо установленной эффективности можно отнести его малую травматичность, универсальность, а также возможность длительного хранения дозированной плазмы, выделенной из плацентарно-пуповинной крови. Плазму пуповинно-плацентарной возможно тестировать и стандартизировать по любым параметрам, заготавливать и хранить готовый препарат непосредственно в клиническом центре для использования по потребности. Кроме того, следует отметить большую доступность рассматриваемого материала по сравнению с любым клеточным.

Простота применения в сочетании с эффективностью позволяет поставить представленный метод лечения в число новых перспективных направлений в комплексной терапии аутизма. Кроме того, полученные результаты также свидетельствуют о возможных перспективах его использования в терапии фармакорезистентных форм эпилепсии как у детей, так и у взрослых.

Список литературы

1. Amiet C., Gourfinkel-An I., Bouzamondo A., et al. Epilepsy in autism is associated with intellectual disability and gender: evidence from a meta-analysis // *Biol Psychiatry*. 2008. Vol. 64. P. 577–582. doi: 10.1016/j.biopsych.2008.04.030
2. Frye R.E., Casanova M.F., Fatemi S.H., et al. Neuropathological mechanisms of seizures in autism spectrum disorder // *Front Neurosci*. 2016. Vol. 10. P. 192. doi: 10.3389/fnins.2016.00192
3. Roulet-Perez E., Deonna T. Autism, epilepsy and EEG epileptiform activity. In: Tuchman R.F., Rapin I. Autism: a neurological disorder of early brain development. London: Mac Keith Press; 2006.
4. Смирнов В.Н., Незнанов Н.Г., Морозова Я.В., и др. Применение концентрата ядросодержащих клеток пуповинной крови у детей с аутизмом: безопасность и эффективность метода // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Т. 121, № 11–2. С. 31–37. EDN: PQUVYA doi: 10.17116/jnevro202112111231
5. Frye R.E., Casanova M.F., Fatemi S.H., et al. Neuropathological mechanisms of seizures in autism spectrum disorder // *Front Neurosci*. 2016. Vol. 10. P. 192. doi: 10.3389/fnins.2016.00192

Мусина Л.А. ✉, Назмутдинов Б.Р., Шангина О.Р., Лебедева А.И.

Применение аллогенного биоматериала для коррекции адьювантного артрита у крыс

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

✉ morphoplant@mail.ru

Аннотация. Внутрисуставное введение аллогенного биоматериала (АБ) на фоне моделирования у крыс адьювантного артрита (АА) ослабляет проявление морфологических признаков генерализованного воспалительного процесса в суставах, снижает степень деструктивных изменений суставного аппарата, сохраняет структуру хряща.

Ключевые слова: аллогенный биоматериал; адьювантный артрит; коленный сустав; генерализованное воспаление.

Musina L.A., Nazmutdinov B.R., Shangina O.R., Lebedeva A.I.

The use of allogenic biomaterial for the correction of adjuvant arthritis in rats

Federal State Budgetary Education Institution of Higher Education "Bashkir State Medical University", Ufa, Russia

Abstract. Intra-articular administration of allogenic biomaterial (AB) against the background of modeling adjuvant arthritis in rats (AA) weakens the manifestation of morphological signs of generalized inflammatory process in joints, reduces the degree of destructive changes in the articular apparatus, preserves the structure of cartilage.

Keywords: allogenic biomaterial; adjuvant arthritis; knee joint; generalized inflammation.

Многие патогенетические методы лечения артритов и артрозов основаны на восстановлении регенеративного потенциала тканей суставов [1]. Один из методов — это введение в параартикулярную область и в полость сустава аллогенного биоматериала (АБ) серии Аллоплант [2, 3]. Однако, механизм действия АБ на ткани и процессы в живом организме при артритах полностью не раскрыт. Цель исследования — изучить влияние АБ на морфологические изменения в суставе крыс при развитии адьювантного артрита. Для моделирования АА в плантарную поверхность задней лапы 60 белым беспородным крысам-самкам вводили полный адьювант Фрейнда (ПАФ). В контрольной группе ($n = 30$) внутрь сустава вводили физиологический раствор; в опытной группе ($n = 30$) вводили диспергированный АБ, изготовленный из сухожилий крыс (5 мг в физиологическом растворе). Интактный контроль — здоровые крысы ($n = 30$). Через месяц забирали коленный сустав с окружающими тканями на стандартное гистологическое исследование. Количественные расчеты осуществлялись с применением программного пакета Statistica 10. Введение ПАФ в лапку крыс вызывало развитие ответной иммунной реакции, выражающейся значительным отеком лапки и суставов. У крыс опытной группы после использования АБ этот клинический признак купировался, отечность лапок и суставов у крыс значительно ослаблялась. У крыс контрольной группы на гистологических препаратах суставов выявлялись признаки дистрофических и деструктивных процессов, проявляющиеся в различной степени тяжести. В синовиальной мембране определялась выраженная пролиферация синовиальных фибробластов, гиперплазия тканей, их отечность, клеточные инфильтраты содержали лимфоциты, плазмциты, макрофаги, фибробласты. Вследствие гиперплазии синовиальной оболочки формировались удлинённые «паннусы», глубоко проникающие в суставную полость. В перихондрии хряща выявлялась дезорганизация соединительной ткани в виде разволокнения и истончения фиброзного слоя, иногда до полного разрушения

поверхности хряща. В сохранившихся участках уменьшалась толщина поверхностного и камбиального слоев. В опытной группе внутрисуставное введение АБ крысам на фоне применения ПАФ ослабляло проявление признаков генерализованного воспалительного процесса в суставах и снижало степень деструктивных изменений суставного аппарата. Структура хрящевого слоя сохранялась, признаков разволокнения, истончения и разрушения перихондрия не обнаруживалось. Хондроциты в хряще имели округлую форму, формировали изогенные группы и лежали в виде вертикальных рядов. У большинства опытных животных в синовиальной мембране характерные для артрита выраженные признаки гиперплазии тканей, их отечности и воспалительные клеточные инфильтраты отсутствовали, паннусы не выявлялись. Строение синовиальной мембраны была близка к норме, хотя определялась ее некоторая повышенная складчатость. В поверхностном слое мембраны синовиальные клетки лежали в 1–2 ряда, признаков выраженной их пролиферации не наблюдалось. У отдельных крыс опытной группы в сравнении с интактной группой было заметно некоторое уменьшение толщины суставного хряща, поэтому мы провели измерение толщины хряща у всех животных. Средний показатель толщины суставных хрящей у крыс жестко зависел от их групповой принадлежности — $\eta^2 = 0,89$, $F = 610$, $p < 0,0001$. Наибольшая толщина хряща ($194,3 \pm 11,9 \mu\text{m}$) была в интактной группе. В опытной группе через 30 дней после введения АБ толщина суставного хряща крыс оказалась достаточно близка к показателю интактной группы ($169,8 \pm 19,6 \mu\text{m}$), но все-таки значимо ($p < 0,0001$) меньше. Кратно наименьшая толщина хряща была в контрольной группе — $88,1 \pm 15,2 \mu\text{m}$. Таким образом, внутрисуставное введение АБ при моделировании у крыс АА оказывает остео- и хондропротективное действие, проявляя при этом положительный противовоспалительный и симптом-модифицирующий эффекты, ослабляя процессы развития грубых морфологических изменений суставов у экспериментальных крыс.

Список литературы

1. Walvekar P., Lulinski P., Kumar P., et al. A review of hyaluronic acid-based therapeutics for the treatment and management of arthritis review // *Int J Biol Macromol*. 2024. Vol. 264, Pt. 2. ID 130645. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130645
2. Патент РФ на изобретение № 2519119 / 10.06.2014. Мулдашев Э.Р., Мусин У.К., Галиахметов Р.Ф. Способ лечения дегенеративных и воспалительно-дегенеративных заболеваний суставов. EDN: PROJXA
3. Кильдебекова Р.Н., Уразбахтин Р.К., Кайбышев В.Т., и др. Эффективность диспергированного биоматериала «Аллоплант» у больных остеоартритом коленного сустава // *Клиническая геронтология*. 2019. Т. 25, № 7–8. С. 48–53. EDN: YSVRDD doi: 10.26347/1607-2499201907-08048-053

Муслимова Э.Ф.¹, Афанасьев С.А.¹, Синенков М.А.², Михеева Э.Р.², Гришин А.С.²,
Егуннов О.А.¹✉, Бощенко А.А.¹

Использование фибробластов для оценки биосовместимости полимерного материала из олигомеров метакрилового ряда

¹ ТНИМЦ НИИ кардиологии, Томск, Россия

² ООО «Айкон Лаб ГмБХ», Нижний Новгород, Россия

✉ egunov_oleg@mail.ru

Аннотация. Работа представляет результаты исследования *in vitro* по оценке биосовместимости и адгезивных свойств двух видов заплат, изготовленных из материала Реперен, одна из которых армирована полиамидной сеткой, в процессе культивирования совместно с фибробластами человека.

Ключевые слова: материал Реперен; разделительная заплата; спаечный процесс; сердечно-сосудистая хирургия; фибробласты.

Muslimova E.F.¹, Afanasiev S.A.¹, Sinenkov M.A.², Mikheeva E.R.², Grishin A.S.²,
Egunov O.A.¹, Boshchenko A.A.¹

The use of human fibroblasts to assess the biocompatibility of polymer material from methacrylic oligomers

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Tomsk, Russia

² IconLab LLC, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. The scientific work presents the results of an *in vitro* study to assess the biocompatibility and adhesive properties of two types of patches made of Reperen material, one of which is reinforced with a polyamide mesh, in the process of cultivation together with human fibroblasts.

Keywords: material Reperen; anti-adhesion patch; adhesion; cardio-vascular surgery; fibroblasts.

Актуальность. В настоящее время признаётся, что одним из ограничений в развитии сердечно-сосудистой хирургии является осложнение доступа к сердцу и магистральным сосудам при проведении реопераций [1]. В качестве возможного подхода для решения этой проблемы предложено использовать специальные разделительные заплаты. Такие заплаты устанавливаются в ходе первичного вмешательства и предупреждают формирование нежелательных спаечных образований и смещение топографо-анатомических ориентиров [2].

Цель исследования: в условиях *in vitro* оценить биосовместимость и адгезивные свойства заплат, изготовленных из полимера на основе олигомеров метакрилового ряда.

Методы. Объектом исследования являлись заплаты, изготовленные из пространственно-сшитых олигомеров метакрилового ряда (материал Реперен), толщиной 0,25 мм (производитель ООО «Айкон Лаб ГмБХ», Россия). Нами исследованы простая заплата (образец А), изготовленная только из материала Реперен, и армированная заплата (образец Б), произведенная из полиамидной сетки, которая со всех сторон покрыта материалом Реперен. Образец Б имел гладкую с одной стороны и шероховатую с другой стороны поверхности ввиду особенностей технологического процесса его производства. Для оценки биосовместимости и адгезивных свойств, заплаты культивировали совместно с фибробластами человека. Фибробласты получали из фрагмента кожи иссечённого в ходе плановой кардиохирургической операции [3]. Выделенные фибробласты культивировали в чашках Петри, используя полную культуральную среду DMEM до образования монослоя. После этого клетки «раздвигали» и на освободившейся поверхности закрепляли исследуемые заплаты. Последующее культивирование при регулярной смене среды продолжалось 14 суток. После этого

срока, образцы фиксировались метанолом в течение 5 минут для последующего морфологического исследования. Образцы окрашивали гематоксилином и эозином, после чего микроскопировали при увеличении $\times 100$, $\times 200$ (Axio Imager.M2, Carl Zeiss, Германия).

Результаты. Инкубация образцов А и Б с культурой фибробластов не оказала негативного влияния на клетки. После 14 суток инкубации с образцами Б было отмечено восстановление монослоя фибробластов в чашках Петри, когда имплантат размещался в чашке Петри шероховатой поверхностью вниз. При этом клетки фиксировались к шероховатой поверхности образца Б. При размещении образца Б на чашке Петри шероховатой поверхностью вверх, фибробласты не проникали под образец и не заселяли его верхнюю поверхность. При наблюдении за образцами А было выявлено, что они плотно прилегают к поверхности чашек Петри и фибробласты под них не проникают. Однако и в этом случае восстанавливался нарушенный монослой фибробластов вокруг образцов, а на верхней поверхности образцов А были выявлены свободно расположенные фибробласты, не имеющие с ним жесткой фиксации.

Выводы. Отсутствие миграции культуры фибробластов от заплат из материала Реперен с и без армирования позволяет говорить об отсутствии токсического действия и негативного влияния на пролиферативную активность фибробластов. Заплата А и гладкая поверхность заплата Б обладают низкой адгезией для культивируемых клеток. Несмотря на адгезию фибробластов на шероховатой поверхности заплата Б, все клетки легко смывались, при промывании заплата в физиологическом растворе.

Список литературы

1. Zhang W., Wang R., Sun Z., et al. Catechol-functionalized hydrogels: biomimetic design adhesion mechanism, and biomedical applications // *Chem Soc Rev.* 2020. Vol. 49, N 2. P. 433–464. doi: 10.1039/c9cs00285e
2. Song L., Li L., He T., et al. Peritoneal adhesion prevention with a biodegradable and injectable N,O-carboxymethyl chitosan-aldehyde hyaluronic acid hydrogel in a rat repeated-injury model // *Sci Rep.* 2016. Vol. 6. ID 37600. doi: 10.1038/srep37600
3. Афанасьев С.А., Муслимова Э.Ф., Нащкина Ю.А., и др. Особенности заселения клеточного материала в матриксы, полученные методом электроформования из поликапролактона, модифицированного поверхностно-активными веществами (тритоном х-100 и поливинилпирролидоном) // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* 2020. №. 2. С. 143–148. EDN: EKXC00

Мухина И.В.¹ ✉, Новикова А.А.¹, Иванова В.О.², Кирпичева А.С.¹, Широкова О.М.¹, Першин В.И.¹

Нейропротекторные свойства гидрогеля на основе децеллюляризованного внеклеточного матрикса в стратегии тканезаместительной терапии при травматических повреждениях головного мозга

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

✉ mukhinaiv@mail.ru

Аннотация. Гидрогель на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса свиной мини-пиг оказывает нейропротекторный эффект, сохраняя жизнеспособность нейронов в очаге повреждения после травмы, активируя нейрогенез и способствуя восстановлению нарушенных функций мозга в эксперименте.

Ключевые слова: децеллюлированный внеклеточный матрикс мозга; черепно-мозговая травма; нейропротекция; регенерация.

Mukhina I.V.¹, Novikova A.A.¹, Ivanova V.O.², Kirpicheva A.S.¹, Shirokova O.M.¹, Pershin V.I.¹

Neuroprotective properties of a hydrogel based on a decellulated extracellular matrix in the strategy of tissue replacement therapy for traumatic brain injury

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Lobachevsky University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. A hydrogel based on the decellulated extracellular matrix of mini-pig has a neuroprotective effect, preserving the viability of neurons in the lesion after brain injury, activating neurogenesis and contributing to the restoration of impaired brain functions in the experiment.

Keywords: decellulated extracellular matrix of the brain; traumatic brain injury; neuroprotection; regeneration.

Внеклеточный матрикс мозга (ВКМ) играет важную роль в развитии и поддержании функциональной активности нейронных сетей мозга. При черепно-мозговой травме наблюдается не только нарушение целостности нейронных сетей, но и внеклеточного матрикса, что потенцирует развитие дегенерации нейронов в посттравматическом периоде.

Одним из направлений в тканезаместительной терапии обширных повреждений мозга является использование биосовместимых гидрогелей, выполняющих самостоятельную роль в замещении матрикса мозга либо в качестве скаффолдов для стволовых клеток при клеточной терапии.

Разработанный биосовместимый и биоразлагаемый гидрогель на основе децеллюлированного матрикса мозга был исследован в качестве тканезаместительной терапии на модели односторонней открытой тяжелой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) у мышей самцов линии C57BL/6 [1].

По результатам оценки потенциальной иммунореактивности разрабатываемый нейротрансплант на основе децеллюлированного матрикса мозга не приводил к увеличению секреции провоспалительных цитокинов при внутричерепном введении у мышей в остром посттравматическом периоде, не вызывал иммуногенную реакцию на имплантацию. Инъекции гидрогеля на основе децеллюлированного ВКМ мозга мини-пига оказали положительное влияние на показатели двигательной и исследовательской активности

у мышей на 30 сутки посттравматического периода по показателям динамики общей пройденной дистанции, динамики средней скорости передвижения, динамики количества вертикальных стоек и динамики количества актов принюхивания у животных в тесте «открытое поле».

Анализ изменения профилей дифференцировки нейронов в области травмы продемонстрировал статистически значимое увеличение соотношения нестин⁺ нейрональных предшественников относительно молодых, даблкортин⁺, и зрелых, MAP2⁺, нейронов, в области травмы в группах с введением нейротрансплантата на основе децеллюлированного матрикса относительно контрольных групп с введением натрий-фосфатного буфера. Примечательно наличие превосходящего стимулирующего эффекта на миграцию и пролиферацию прогениторов в области травмы у нейротрансплантата на основе децеллюлированного матрикса мозга относительно коммерческого продукта на основе коллагена I типа «Viscoll».

Таким образом, в исследовании показано, что использование гидрогеля на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса свиной миниpigов оказывает нейропротекторный эффект, сохраняя жизнеспособность нейронов в очаге повреждения, активируя нейрогенез и способствуя восстановлению нарушенных функций мозга.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121030100282-6.

Список литературы

1. Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Gladkov A.A., et al. Transplantation of neural progenitor cells in hyaluronic hydrogel in traumatic brain injury in experiment // Modern Technologies in Medicine. 2017. Vol. 9, N 4. P. 106–114. EDN: YMQNRN doi: 10.17691/stm2017.9.4.13

Надараиа К.В.¹✉, Пяткова М.А.^{1,2}, Плешкова А.И.^{1,2}, Белов Е.А.¹, Имшинский И.М.¹, Герасименко М.С.^{1,2}, Манжуло И.В.³, Пономаренко А.И.³, Машталяр Д.В.¹

Биоактивные гибридные покрытия на имплантационных материалах, полученных аддитивными технологиями

¹ Институт химии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, Россия

✉ nadaraiakv@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты исследования титановых и магниевых имплантатов, полученных аддитивными технологиями, с биоактивными гибридными покрытиями. Установлено наличие у материалов состава, близкого к костной ткани, а также антибактериальных и противовоспалительных свойств.

Ключевые слова: биоактивные материалы; антибактериальные материалы; биорезорбируемые имплантаты; остеогенерация; остеоинтеграция; магний; титан; плазменное электролитическое оксидирование; искровое плазменное спекание; селективное лазерное плавление.

Nadaraia K.V.¹, Piatkova M.A.^{1,2}, Pleshkova A.I.^{1,2}, Belov E.A.¹, Imshinetskiy I.M.¹, Gerasimenko M.S.^{1,2}, Manzhulo I.V.³, Ponomarenko A.I.³, Mashtalyar D.V.¹

Bioactive hybrid coatings on implant materials obtained by additive technologies

¹ Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

³ A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. The paper presents the results of a study of titanium and magnesium implants obtained by additive technologies with bioactive hybrid coatings. It was established that the materials have a composition close to bone tissue, as well as antibacterial and anti-inflammatory properties.

Keywords: Bioactive materials; antibacterial materials; bioresorbable implants; osteogeneration; osseointegration; magnesium; titanium; plasma electrolytic oxidation; spark plasma sintering; selective laser melting.

В настоящее время перед исследовательскими коллективами по всему миру стоит задача разработки новых имплантационных материалов для ортопедии, что обусловлено целым рядом причин. К ним в первую очередь следует отнести следующие: необходимость снижения рисков возникновения инфекций в месте хирургического вмешательства (антибактериальные свойства); сведение к минимуму вероятности отторжения имплантата (биосовместимость); повышение скорости выздоровления пациента (остеогенерация); соответствие имплантата анатомическим особенностям пациента (персонализированная медицина); а также возможность проведения хирургических операций для пациентов с остеосаркомой или входящих в группу риска.

Известно, что правильный выбор материалов для изготовления имплантатов имеет решающее значение в реабилитации пациентов [1]. Так, переломы эпифизов костей лишены надкостницы и для их сращения часто необходим остеосинтез. В таком случае крайне важную роль играет имплантат, не только фиксирующий поврежденные участки кости, но также и в значительной степени ускоряющий регенерацию костной ткани. Более того, с учетом постепенного старения населения при имплантации важнейшее значение приобретают

анатомические особенности человека, число которых может увеличиваться с возрастом. Следовательно, в таком случае одной из главных задач будет являться применение аддитивных технологий, которые позволяют персонализировать имплантат, тем самым повысив не только надежность создаваемого изделия, но также и ускорив процесс выздоровления [1]. Более того, создаваемые имплантаты должны иметь близкие к естественной костной ткани механические характеристики, а в случае применения биорезорбируемых материалов — и коррозионные свойства, обеспечивающие требуемую скорость резорбции, сравнимую со скоростью регенерации костной ткани.

Наряду с вышеобозначенными проблемами, важнейшей задачей является предотвращение возникновения в месте проведения хирургического вмешательства имплантат-ассоциированных инфекций (ИАИ), которые могут не только увеличивать время выздоровления, но также и приводить к отторжению имплантата, а в случае тяжелого течения — к летальному исходу [2].

Отметим также, что в особую группу входят пациенты, имеющие остеогенную саркому, для которых проведение любого хирургического вмешательства, тем более с целью внедрения погружного имплантата, может приводить к целому спектру нежелательных последствий. Это, в свою очередь, снижает варибельность хирургической помощи таким пациентам.

В данном исследовании представлены подходы, направленные на решение всех перечисленных задач. Путем применения таких аддитивных технологий, как искровое плазменное спекание (ИПС) и селективное лазерное плавление (СЛП), созданы имплантаты с высокой удельной поверхностью, позволяющей повысить остеоинтеграцию. В качестве исходных материалов были использованы не только хорошо зарекомендовавший себя в имплантационной хирургии титан, но и инновационный биорезорбируемый магниевый сплав. Дополнительно, методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) на поверхности полученных имплантатов синтезированы гетерослои, содержащие в своем составе гидроксиапатит (ГА), являющийся основным неорганическим компонентом костной ткани. Формируемая ПЭО развитая пористая структура позволила не только получить гидрофильную поверхность с оптимальными для адгезии клеток [3] значениями свободной энергии поверхности (73 ± 4 мДж/м²), но внедрить в структуру поверхности различные лекарственных препаратов, обеспечивающих остеогенерацию (менахинон МК-7) и антибактериальные (ванкомицин) и антирезорбтивные свойства (золедронат). С целью обеспечения постепенного, в том числе послойного релиза веществ использовался полидофамин, дополнительно являющийся центром кристаллизации ГА.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что в данной работе получены имплантаты, сочетающие в себе целый спектр критически важных свойств, а также обеспечивающие таргетную доставку лекарственных препаратов.

Список литературы

1. Li J., Cui X., Hooper G.J., Lim K.S., et al. Rational design, bio-functionalization and biological performance of hybrid additive manufactured titanium implants for orthopaedic applications: a review // *J Mech Behav Biomed Mater*. 2020. Vol. 105. ID 103671. doi: 10.1016/j.jmbbm.2020.103671
2. Nadaraia K.V., Mashtalyar D.V., Piatkova M.A., et al. Antibacterial HA-coatings on bioresorbable Mg alloy // *J Magnes Alloy*. 2024. Vol. 12. P. 1965–1985. doi: 10.1016/j.jma.2024.05.006
3. Majhy B., Priyadarshini P., Sen A.K. Effect of surface energy and roughness on cell adhesion and growth — facile surface modification for enhanced cell culture // *RSC Adv*. 2021. Vol. 11. P. 15467–15476. doi: 10.1039/D1RA02402G

Назарова Е.А.¹✉, Примакова Е.А.¹, Сыманович А.А.¹, Юркина Е.Г.¹, Романова И.А.¹, Дедюля Н.И.¹,
Ефимов Д.Ю.¹, Садовский Д.Н.¹, Киреева А.И.², Кривенко С.И.¹, Щерба А.Е.¹, Руммо О.О.¹

Получение и характеристика децеллюляризованного матрикса печени

¹ ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

² ГНУ «Институт генетики и цитологии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

✉ k.nazarova-86@mail.ru

Аннотация. Непригодные для трансплантации печеночные графты являются оптимальным ресурсом для создания децеллюляризованного внеклеточного матрикса печени человека, который может быть заселён гепатоцитами и мезенхимальными клетками человека для создания «биоинженерной печени», востребованной в условиях недостатка качественных донорских органов для трансплантации.

Ключевые слова: печень человека; перфузионная децеллюляризация; скаффолд.

Nazarova E.A.¹, Primakova E.A.¹, Symanovich A.A.¹, Yurkina E.G.¹, Romanova I.A.¹, Dedyulia N.I.¹,
Efimov D.Yu.¹, Sadouski D.N.¹, Kireeva A.I.², Krivenko S.I.¹, Shcherba A.E.¹, Rummo O.O.¹

Obtaining and characterization of decellularized liver matrix

¹ Minsk scientific and practical center of surgery, transplantology and hematology, Minsk, Republic of Belarus

² Institute of genetics and cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. Liver grafts unsuitable for transplantation are the optimal resource for creating a decellularized extracellular matrix of the human liver, which can be recellularisation with human hepatocytes and mesenchymal cells to obtain a “bioengineered liver”, which is in demand in conditions of a lack of high-quality donor organs for transplantation.

Keywords: human liver; perfusion decellularization; scaffold.

Цель исследования — оценка качества проведенной перфузионной децеллюляризации печени человека, а также возможности рецеллюляризации полученного бесклеточного матрикса.

Материалом для перфузионной децеллюляризации являлись 3 образца целой печени человека или сегмента (правая доля или левый латеральный сектор), полученных согласно описанного ранее алгоритма [1]. Эффективность девитализации оценивалась методом электронной сканирующей микроскопии, морфологическим исследованием с применением окраски гематоксилин-эозином, методом определения остаточной ДНК в экстрацеллюлярном матриксе. Цитотоксичность оценивали по апоптозу мезенхимальных клеток человека в культуре (в присутствии фрагмента скаффолда), а также по скорости образования клеточного монослоя на приборе прижизненной визуализации IncuCyte S3 (Sartorius, США).

Для перфузионной децеллюляризации печени человека было применено устройство для динамической консервации органов, разработанное в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» совместно с ЗАО «СоларЛС». После принятия решения о непригодности донорской печени для трансплантации печеночный графт эксплантировался у умершего донора по стандартной методике, промывался физиологическим раствором натрия хлорида 0,9% и затем помещался в холодильную камеру с температурой минус 18 — минус 22°C; после размораживания канюлировались долевыми печеночными артериями и ветви воротной вены, печень помещалась в резервуар устройства для машинной перфузии с подключением канюль к перфузионному контуру. После длительной непрерывной перфузии дистиллированной

водой и 4% раствором «Тритон-Х-100» и истечении периода холодильного орган промывали раствором, содержащим ДНК-азу, хлорид кальция и хлорид магния, при температуре 37–38°C на протяжении 6–8 часов. Затем выполнялась биопсия для оценки качества перфузии.

В результате исследования получены скаффолды ($n = 3$) мягко-эластичной консистенции с неповрежденной капсулой. Элементы сосудов и стромы в паренхиме контурировались на разной глубине от капсулы, паренхима имела оливковый цвет, артерии и вены левого латерального сектора упругие и эластичные, без повреждений. При электронной микроскопии и при гистологическом исследовании (окраска гематоксилин-эозином) в опытных образцах ткань печени была представлена соединительным каркасом с белково-жировыми каплями без клеточного компонента. Тонкие волокна соединительной ткани синусоидов печени переплетались друг с другом, формируя структуры напоминающие соты неправильной формы и размеров. Концентрация остаточной ДНК в девитализированных печеночных скаффолдах была значительно ниже, чем в нативной печени и составила от 3,275 нг/мкл до 3,708 нг/мкл ($n = 3$) в 50 мкл элюированной ДНК по сравнению с 70,885 нг/мкл ($n = 6$; 20,444; 118,328 нг/мкл) контроля. В результате прижизненного анализа культур мезенхимальных клеток человека в присутствии фрагментов скаффолдов было установлено, что децеллюляризованные фрагменты печени не только не замедляли образование монослоя в культуре, но даже стимулировали клеточный рост через 24 часа (апоптотические клетки окрашивались при взаимодействии с реагентом «Annexin V Green Reagent for Apoptosis» в зеленый цвет). Изложенные результаты свидетельствуют о возможности получения бесклеточных скаффолдов печени человека для последующей ревитализации *in vitro* и создания тканеинженерных конструкций на их основе.

Список литературы

1. Садовский Д.Н., Ефимов Д.Ю., Назарова Е.А. и др. Использование машинной перфузии при децеллюляризации непригодной для трансплантации печени человека для создания бесклеточного матрикса // Медицинский журнал. 2023. Т. 86, № 4. С. 114–120. EDN: ZJLTUG doi: 10.51922/1818-426X.2023.4.114

Наместникова Д.Д.^{1,2}, Черкашова Э.А.^{1,2}, Гумин И.С.¹, Губский Л.В.^{1,2}, Ярыгин К.Н.³, Губский И.Л.^{1,2} ✉

Морфометрический анализ МР-данных экспериментального инфаркта мозга на основе архитектуры Swin UNETR

¹ ФГБУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России», Москва, Россия

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

³ ФГБУН «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН», Москва, Россия

✉ gubskiy.ilya@gmail.com

Аннотация. МРТ позволяет повысить эффективность морфометрического анализа экспериментального инфаркта мозга. Часто морфометрия включает в себя ручную сегментацию, что вносит необъективность в результаты. В данной работе описана модель машинного обучения для автоматической сегментации очага с использованием архитектуры Swin UNETR.

Ключевые слова: ишемический инсульт; модель экспериментального инфаркта мозга; эндоваскулярная окклюзия средней мозговой артерии; МРТ; морфометрия; искусственный интеллект.

Namestnikova D.D.^{1,2}, Cherkashova E.A.^{1,2}, Gumin I.S.¹, Gubskii L.V.^{1,2}, Yarygin K.N.³, Gubskii I.L.^{1,2}

Morphometric analysis of MR data of experimental cerebral infarction based on Swin UNETR architecture

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. MRI allows to increase the efficiency of morphometric analysis of experimental stroke. Morphometry often includes manual segmentation, which introduces bias into the results. In this paper, a machine learning model for automatic stroke segmentation using the Swin UNETR architecture is described.

Keywords: ischemic stroke; experimental stroke model; endovascular occlusion of the middle cerebral artery; MRI; morphometry; artificial intelligence.

Одним из методов оценки эффективности терапии экспериментального инфаркта мозга является морфометрический анализ объема очага в динамике. Данный подход позволяет уменьшить количество экспериментальных животных, так как нет необходимости в проведение гистологического исследования на каждой временной точке, а также позволяет наблюдать за одним животным в динамике и выявлять ранние осложнения моделирования. Введение МРТ в качестве исследовательского инструмента значительно изменило подход к визуализации инфаркта мозга, превратив данный метод в незаменимый инструмент как в клинической практике, так и в научных исследованиях.

Однако, несмотря на очевидные преимущества МРТ, морфометрический анализ данных, полученных с помощью этого метода, по-прежнему часто осуществляется вручную. Исследователи вручную выделяют необходимые области на каждом срезе мозга или используют полуавтоматические методы сегментации. Такой подход делает результаты исследования зависимыми от опыта и квалификации оператора, что может стать источником ошибок и расхождений в получаемых результатах. Одним из возможных решений данной проблемы является использование систем автоматической сегментации инфаркта мозга на основе данных МРТ.

В ходе выполнения работы был проведен анализ данных, полученных в ходе экспериментальной работы с моделью эндоваскулярной окклюзией средней мозговой артерии на экспериментальной МР-системе

ClinScan (Bruker BioSpin, США) с индукцией магнитного поля 7 Тл. В исследование были включены данные 153 экспериментальных животных с моделью острой фокальной ишемии и 41 интактное животное, которым проводилось МР-сканирование с использованием изотропных T2-взвешенных изображений головного мозга. На всех изображениях с инфарктом мозга была произведена разметка очага путем ручной сегментации с использованием программного пакета 3D Slicer. Разметку выполняли четыре исследователя (два врача-невролога и два врача-рентгенолога) с опытом экспериментальной и клинической работы более 5 лет, что позволило собрать разнообразный набор данных для последующей работы. Полученная выборка была разделена в пропорции 5:1 на обучающую и валидационную в случайном порядке. Для создания модели использовался PyTorch и фреймворк MONAI. Все данные проходили через коррекцию интенсивности МР-сигнала на изображениях, данная проблема связана с использованием поверхностной катушки сканирования, использовался алгоритм N4 Bias Field Correction. Помимо этого, все данные приводились к одному размеру вокселя (0,2×0,2×0,2 мм) и одному размеру поля сканирования путём обрезки краёв. Затем происходила нормализация интенсивности сигнала на изображениях. Обучающая выборка подвергалась аугментации в виде применения аффинной трансформации, поворота изображений, добавления шума и случайного смещения среднего значения интенсивности сигнала на изображениях.

В качестве дизайна обучаемой модели была выбрана современная архитектура семантической сегментации Swin UNet Transformers (Swin UNETR) [1]. В качестве финальной метрики использовался критерий, объединяющий Dice loss и Cross Entropy Loss. В результате обучения была получена модель с метрикой в 0,8961, что для высокого разрешения и специально созданной вариативностью при разметке данных (четыре исследователя) мы считаем хорошим результатом. Следующим этапом стала имплементация обученной модели в код с возможностью последующего подсчета объема сегментированной области мозга.

В результате работы был разработан алгоритм, который автоматически сегментирует и подсчитывает объем очага инфаркта на основе данных МР-исследований. Данный алгоритм позволяет повысить объективность и точность морфометрического анализа при оценке данных терапии экспериментального инфаркта мозга, минимизируя влияние человеческого фактора и обеспечивает более стабильные и воспроизводимые результаты.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 23-25-00300).

Список литературы

1. Hatamizadeh A., Nath V., Tang Yu., et al. Swin UNETR: swin transformers for semantic segmentation of brain tumors in MRI images // ArXiv. 2022, abs/2201.01266. doi: 10.48550/arXiv.2201.01266

Наместникова Д.Д.^{1,2} ✉, Черкашова Э.А.^{1,2}, Губский И.Л.^{1,2}, Коваленко Д.Б.¹, Самойлова Е.М.²,
Покусаева И.А.³, Сухинич К.К.¹, Мельников П.А.⁴, Чехонин В.П.^{1,4}, Баклаушев В.П.^{1,2}

Совместное введение нейральных прогениторных клеток и мезенхимальных стволовых клеток при экспериментальном ишемическом инсульте повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера для клеток и эффективность клеточной терапии по сравнению с монотерапией

¹ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

² Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАН, Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В.П. Сербского, Москва, Россия

✉ dadnam89@gmail.com

Аннотация. Клеточная терапия с использованием различных типов стволовых клеток является перспективным методом лечения ишемического инсульта. Целью данного исследования была оценка эффективности комбинированного введения нейральных прогениторных клеток и мезенхимальных стволовых клеток на модели экспериментального ишемического инсульта у крыс.

Ключевые слова: экспериментальный ишемический инсульт; клеточная терапия; мезенхимальные стволовые клетки; нейральные прогениторные клетки; внутриартериальная трансплантация.

Namestnikova D.D.^{1,2}, Cherkashova E.A.^{1,2}, Gubskiy I.L.^{1,2}, Kovalenko D.B.¹, Samoilova E.M.²,
Pokusaeva I.A.³, Sukhinich K.K.¹, Melnikov P.A.⁴, Chekhonin V.P.^{1,4}, Baklaushev V.P.^{1,2}

Co-administration of neural progenitor cells and mesenchymal stem cells in experimental ischemic stroke increases the permeability of the blood-brain barrier for the cells and the effectiveness of cell therapy compared to neural progenitor cell monotherapy

¹ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

² Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

⁴ Serbsky Federal Medical Research Centre of Psychiatry and Narcology, Moscow, Russian

Abstract. Cell therapy using different types of stem cells is a promising method for ischemic stroke treatment. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of combined administration of neural progenitor cells and mesenchymal stem cells in a model of experimental ischemic stroke in rats.

Keywords: experimental ischemic stroke; cell therapy; mesenchymal stem cells; neural progenitor cells; intra-arterial transplantation.

Ишемический инсульт (ИИ) является социально значимым заболеванием, требующим поиска и разработки новых методов терапии, направленных на регенерацию нервной ткани. Клеточная терапия является перспективной и многообещающей стратегией для лечения ИИ. В экспериментальных исследованиях на животных моделях церебральной ишемии были протестированы различные типы стволовых и прогениторных клеток, и среди них мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и нейральные стволовых/прогениторные клетки

(НСК/НПК) оказались наиболее эффективными и безопасными. На основании положительных результатов большого количества доклинических исследований, несмотря на отсутствие полного понимания точных механизмов терапевтического действия трансплантированных клеток, был проведен ряд клинических испытаний, посвященных трансплантации МСК и НСК/НПК пациентам с ИИ [1, 2]. Проведенные исследования показали безопасность и осуществимость клеточной трансплантации МСК и НПК как системно, так и интрацеребрально, а также тенденцию к улучшению состояния пациентов, однако не во всех исследованиях было статистически подтверждено уменьшение выраженности неврологического дефицита. Актуальной задачей для современной медико-биологической науки является дальнейшее проведение фундаментальных исследований, посвященных изучению механизмов действия стволовых/прогениторных клеток при инфаркте мозга, оптимизации протокола трансплантации, а также поиску способов усиления терапевтического действия клеточной терапии при ИИ. Одним из таких способов по повышению эффективности может стать комбинированная трансплантация различных типов стволовых/прогениторных клеток для потенцирования их положительного действия [3]. Целью данного исследования была оценка терапевтической эффективности совместного внутриартериального введения нейральных прогениторных клеток и мезенхимальных стволовых клеток на модели экспериментального ишемического инсульта у крыс.

Самцам крыс Wistar ($n = 65$) выполнялось моделирование экспериментального инфаркта головного мозга методом транзиторной (90 мин) эндоваскулярной окклюзии средней мозговой артерии, после чего через 24 часа выполняли внутриартериальную трансплантацию через правую внутреннюю сонную артерию. Было выделено 4 экспериментальные группы: группа с комбинированной трансплантацией человеческих НПК, полученных методом прямого репрограммирования [4], в дозе $3,5 \times 10^5$ и человеческих плацентарных МСК в дозе $2,5 \times 10^5$; группы с монотрансплантацией НПК в дозе 7×10^5 и МСК в дозе 5×10^5 ; контрольная группа с введением физиологического раствора 1 мл. У всех животных в течение 14 дней оценивалась выживаемость, неврологический дефицит (шкала оценки тяжести инсульта у грызунов mNSS) и объем очага инфаркта по данным МРТ. Также оценивалась распределение трансплантированных клеток в головном мозге методом МРТ и гистологического исследования.

Было показано, что совместная трансплантация НПК и МСК статистически значимо улучшала выживаемость животных, а также приводила к значимому уменьшению выраженности неврологического дефицита и уменьшению объема очага инфаркта головного мозга относительно группы контроля. Было также продемонстрировано, что совместное введение приводило к лучшей выживаемости лабораторных животных после экспериментального ишемического инсульта по сравнению с группой, получавшей монотерапию НПК. По динамике уменьшения неврологического дефицита статистически достоверных различий между группами с комбинированной и монотерапией выявлено не было. В группе с комбинированной клеточной трансплантацией происходил значимо более быстрый и выраженный регресс очага инфаркта мозга по сравнению с обеими группами с монотерапией. В ходе исследования были получены новые данные о характере распределения и миграции МСК и НПК в головном мозге. Было показано, что оба типа клеток после внутриартериальной трансплантации распределялись в правом полушарии, преимущественно в зоне инфаркта и перинфарктной области, и находились в тесном контакте с внутренней стенкой церебральных сосудов в течение 48–72 часов, после чего более не детектировались. При совместной трансплантации НПК и МСК у части животных удалось визуализировать прохождение НПК через структуры гематоэнцефалического барьера: клетки визуализировались в веществе мозга вблизи нейроваскулярной ниши и задерживались в головном мозге дольше, чем при монотерапии. Причина изменения характера миграции НПК при совместном введении с МСК требует дальнейшего изменения, но наиболее вероятно может быть связана с иммуномодулирующими свойствами МСК.

Согласно полученным результатам, можно сделать вывод, что совместная внутриартериальная трансплантации НПК и МСК при экспериментальном ишемическом инсульте у крыс приводит к выраженному терапевтическому эффекту, превосходящему по силе монотерапию. Комбинированная трансплантация НПК совместно с МСК также приводит к повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера для НПК и изменению характера их миграции в головном мозге.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

Список литературы

1. Hovhannisyan L., Khachatryan S., Khamperyan A., et al. A review and meta-analysis of stem cell therapies in stroke patients: effectiveness and safety evaluation // *Neurol Sci.* 2024. Vol. 45, N 1. P. 65–74. doi: 10.1007/s10072-023-07032-z
2. Huang H., Zhang J., Lin J., et al. Efficacy and safety of mesenchymal stem cells in patients with acute ischemic stroke: a meta-analysis // *BMC Neurol.* 2024. Vol. 24, N 1. P. 48. doi: 10.1186/s12883-024-03542-1
3. Namestnikova D.D., Cherkashova E.A., Sukhinich K.K., et al. Combined cell therapy in the treatment of neurological disorders // *Biomedicines.* 2020. Vol. 8, N 12. P. 613. doi: 10.3390/biomedicines8120613
4. Ahlfors J.E., Azimi A, El-Ayoubi R, et al. Examining the fundamental biology of a novel population of directly reprogrammed human neural precursor cells // *Stem Cell Res Ther.* 2019. Vol. 10, N 1. P. 166. doi: 10.1186/s13287-019-1255-4

Насибов Т.Ф.^{1,2} ✉, Горохова А.В.^{1,2}, Порохова Е.Д.^{1,2}, Старосветская А.А.², Бариев У.А.¹, Носов В.Е.³, Казанцева Е.А.⁴, Акимова Е.Б.⁴, Комарова Е.Г.⁴

Изучение остеогенной активности кальций-фосфатных покрытий с добавлением биodeградируемого гидрогеля, содержащего ванкомицин

¹ Лаборатория клеточных и микрофлюидных технологий, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

² Кафедра морфологии и общей патологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

³ Кафедра нормальной физиологии, ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия

⁴ Лаборатория физики наноструктурных биокomпозитов, Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

✉ temur.nsbv@gmail.com

Аннотация. Эффективным способом предотвращения перипротезной инфекции считается модификация кальций-фосфатных покрытий на имплантатах для пролонгированного выделения антимикробных лекарств. Данная работа раскрывает *in situ* эффекты таких покрытий на остеогенез с помощью теста эктопического костеобразования.

Ключевые слова: остеогенез; кальций-фосфатные покрытия; ванкомицин; мезенхимные стволовые клетки; тест эктопического остеогенеза.

Nasibov T.F.^{1,2}, Gorokhova A.V.^{1,2}, Porokhova E.D.^{1,2}, Starosvetskaya A.A.², Bariev U.A.¹, Nosov V.E.³, Kazantseva E.A.⁴, Akimova E.B.⁴, Komarova E.G.⁴

Study of osteogenic activity of calcium phosphate coatings with the addition of biodegradable hydrogel containing vancomycin

¹ Laboratory of Cellular and Microfluidic Technologies, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Department of Morphology and General Pathology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

³ Department of Normal Physiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

⁴ Laboratory of Physics of Nanostructured Biocomposites, Institute of Strength Physics and Materials Science SB RAS, Tomsk, Russia

Abstract. Modification of calcium phosphate coatings on implants for prolonged release of antimicrobial drugs is considered an effective way to prevent periprosthetic infection. This work reveals *in situ* effects of such coatings on osteogenesis using an ectopic bone formation test.

Keywords: osteogenesis; calcium phosphate coatings; vancomycin; mesenchymal stem cells; ectopic osteogenesis test.

Постимплантационные осложнения являются важной проблемой современной хирургии. По современным данным, у 10–20% пациентов, перенесших эндопротезирование или остеосинтез, развиваются перипротезные инфекционные осложнения [1, 2]. Стратегии, используемые для их лечения, можно разделить на две основные группы: системная антибактериальная терапия, с эффективностью 76,8% и более эффективное (90,8%) местное пролонгированное использование антибиотиков за счет многочисленных модификаций покрытий имплантатов [3]. При этом остеогенные возможности модифицированных поверхностей имплантатов, функционирующих как система доставки лекарства, остаются плохо изученными. Целью настоящего исследования было изучение остеогенной активности микродуговых кальций-фосфатных покрытий,

модифицированных гидрогелем разной плотности с введением в состав ванкомицина. Для исследования были изготовлены титановые подложки, несущие рельефное (шероховато-пористое) кальций-фосфатное покрытие (CaP), сформированное в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск) микро-дуговым способом. На часть подложек дополнительно был нанесен слой гидрогеля, состоящего из биодegradуемых полиэфигов молочной и гликолевой кислот (PLGA) в разных концентрациях (5 или 10%), с введением в состав ванкомицина (VMN) и без такового [4]. Эксперимент проводили на 36 самцах мышей линии Balb/c, из которых 12 являлись донорами костного мозга (KM). KM наносили *in vitro* на титановые подложки с разными модификациями и культивировали в течение 45 минут до операции. Основной группе животных (24 шт.) проводили подкожную имплантацию образцов: под наркозом выполнялся разрез кожи, тупым способом формировался боковой карман в подмышечной области с последующим внесением по одной подложке со столбиком KM. Всего было сформировано 6 групп по четыре особи в каждой: Ti + CaP (группа CaP); CaP с нанесением 5% PLGA (CaP + 5P) или 10% PLGA (CaP + 10P), а также CaP с нанесением PLGA в соответствующих концентрациях и введением в состав VMN (CaP + V, CaP + 5P + V, CaP + 10P + V). Через 45 дней животных выводили из эксперимента и извлекали подложки, с их поверхности снимали тканевые пластинки (ТП), из которых изготавливали гистологические препараты. На окрашенных гематоксилином-эозином срезах оценивали наличие локальной периимплантационной воспалительной реакции, формирование тканевых структур и подсчитывали удельную площадь (УП) сформировавшихся *de novo* кости и KM при помощи программы ImageJ (ver. 1.53j). Статистическую обработку данных проводили в среде RStudio (ver. 2024.04.2+764) на языке программирования R (ver. 4.4.1) при помощи точного теста Фишера, критерия множественного сравнения Ван дер Вердена, апостериорного теста Стил–Двасса и парного теста Брунера–Мюнзеля ($p < 0.05$). Для всех покрытий в тканях, окружавших имплантаты, не наблюдалось признаков воспаления или деструктивных изменений, что может говорить о биосовместимости исследуемых образцов. При изучении тканевого состава ТП обнаружено, что в группах CaP, CaP + 5P, CaP + 10P кость и KM формировались в 100% случаев; при этом максимальные значения УП костной ткани (среди названных групп) наблюдались в композите CaP + 10P. Между остальными группами различий УП KM не обнаружено. При добавлении VMN в покрытия наблюдалось изменение частоты формирования кости: ее значимое снижение до 50% (2 из 4 имплантированных образцов) отмечено в группе CaP + V; в группе CaP + 5P + V значение составило 75%, в группе CaP + 10P + V — 100%. Тем не менее, при оценке УП костной ткани прирост площади (до 30% к контрольной группе CaP) наблюдался в CaP + V в группе, в то время как остальные группы не отличались друг от друга. Кроме того, добавление VMN оказывало влияние на образование KM. В группе CaP + V наблюдалась 100% частота формирования KM; однако, в группе CaP + 5P + V выход KM в составе ТП значимо снижался до 67%, и максимально уменьшался до 50% в группе CaP + 10P + V. Вместе с тем, в образцах со сформировавшейся ТП УП KM в группе CaP + 5P + V была меньше на 46%, чем без добавления VMN (CaP + 5P), тогда как в CaP + 10P + V показало максимальное увеличение на 55%, в сравнении с CaP + 10P; значимых изменений УП KM в остальных группах не наблюдалось. Таким образом, модификация CaP-покрытия с помощью нанесения PLGA разных концентраций шликерным методом (пропиткой) не влияет на частоту образования эктопической кости и KM, а также на УП KM. В то же время, нанесение 10% PLGA приводит к увеличению УП костной ткани, что свидетельствует об остеогенных свойствах композитных покрытий на уровне мезенхимных стволовых клеток, иницирующих *de novo* эктопический остеогенез и гемопоэз. Пропитка «чистых» CaP покрытий VMN несет риск неопределённых результатов, по-видимому, вследствие быстрого высвобождения антибиотика с достижением его токсических концентраций. В свою очередь, PLGA + VMN на CaP покрытии формирует систему пролонгированного выделения, которая при разных концентрациях биодegradуемого полимера позволяет управлять высвобождением VMN, влияющим на остеогенные свойства композитных покрытий.

Список литературы

1. Yalikhun A., Yushan M., Li W., et al. Risk factors associated with infection recurrence of posttraumatic osteomyelitis treated with Ilizarov bone transport technique — a retrospective study of 149 cases // BMC Musculoskelet Disord. 2021. Vol. 22, N 1. P. 573. doi: 10.1186/s12891-021-04430-2

2. Subramanyam K.N., Mundargi A.V., Prabhu M.V., et al. Surgical management of chronic osteomyelitis: Organisms, recurrence and treatment outcome // *Chin J Traumatol.* 2023. Vol. 26, N 4. P. 228–235. doi: 10.1016/j.cjtee.2023.01.003
3. Arshad Z., Lau E.J., Aslam A., et. al. Management of chronic osteomyelitis of the femur and tibia: a scoping review // *EFORT Open Reviews.* 2021. Vol. 6, N 9. P. 704–715. doi: 10.1302/2058-5241.6.200136
4. Komarova E.G., Akimova E.B., Kazantseva E.A., et al. Wettability, topography and chemistry of composite PLGA/CaP/Ti scaffolds for targeted drug delivery // *Russ Phys J.* 2024. Vol. 67, N 5. P. 533–541. EDN: XRTWNS doi: 10.1007/s11182-024-03154-9

Насыбуллина Э.И. ✉, Тимофеева А.В., Гарифуллина А.А., Ахметзянова Э.Р.

Динамические изменения концентрации цитокинов в сыворотке крыс в зависимости от степени повреждения и посттравматического периода травмы спинного мозга

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ evelineva28@gmail.com

Аннотация. Травма спинного мозга (ТСМ) вызывает изменения в выработке про- и противовоспалительных цитокинов. Цель исследования — выявить изменения концентрации цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-10, RANTES и MCP-1 в сыворотке крови крыс при ТСМ различной степени тяжести в острый, подострый и хронический периоды.

Ключевые слова: травма спинного мозга; цитокины; крысы.

Nasybullina E.I., Timofeeva A.V., Garifullina A.A., Akhmetzyanova E.R.

Dynamic changes in the concentration of cytokines in the serum of rats depending on the degree of damage and the post-traumatic period of spinal cord injury

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Spinal cord injury (SCI) causes changes in the production of pro- and anti-inflammatory cytokines. The aim of the study was to identify changes in the concentration of cytokines IL-1 β , IL-4, IL-10, RANTES and MCP-1 in the blood serum of rats with SCI of varying severity in acute, subacute and chronic periods.

Keywords: spinal cord injury; cytokines; rats.

Травма спинного мозга (ТСМ) является тяжёлым заболеванием, приводящим к инвалидизации и ухудшению качества жизни. Данное заболевание начинается с механического повреждения, за которым следует вторичная фаза, постепенно приводящая к разрушению нервной ткани. Терапевтическая стратегия, направленная на снижение нейровоспаления, представляется ключевым направлением разработки новых подходов к лечению ТСМ.

Цитокины представляют собой белковые молекулы, играющие важную роль в регуляции воспалительных процессов. После ТСМ наблюдается значительное изменение секреции различных цитокинов, которые вырабатываются микроглией, астроцитами, иммунными клетками периферического происхождения и эндотелиальными клетками. Вышеуказанные изменения могут способствовать развитию как защитных, так и патологических реакций.

Цель нашего исследования — выявить изменения в секреции цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-10, RANTES и MCP-1 в сыворотке крови крыс в зависимости от тяжести ТСМ и посттравматического периода.

Сыворотка крови забиралась из хвостовой вены крыс с контузионной травмой легкой (1,5 м/с), средней (2,5 м/с) и тяжелой (4 м/с) степени тяжести в различные временные периоды: на 3, 7 и 14 сутки. Образцы были проанализированы методом мультиплексного иммуноанализа.

Полученные результаты показали, что секреция IL-1 β , обладающего сильным провоспалительным действием, была значительно увеличена в группе со средней степенью тяжести ТСМ в остром периоде на 3 сутки

при сравнении с другими группами, после чего произошло последовательное уменьшение концентрации на 7 и 14 сутки. Это свидетельствует о ранней активации и постепенном снижении воспалительных реакций при ТСМ средней степени тяжести.

Содержание противовоспалительного цитокина IL-4 в сыворотке крови крыс в большинстве групп было ниже при сравнении с интактным контролем, с наименьшим значением в группе с легкой ТСМ на 14 сутки (~в 8 раз ниже). Самая высокая концентрация наблюдалась в группе 1,5 м/с на 7 сутки, что говорит о более длительной активации противовоспалительных процессов в ответ на менее выраженное повреждение с резким снижением в отсроченный период после ТСМ.

В результате анализа секреции противовоспалительного цитокина IL-10 было обнаружено постепенное повышение концентрации данной молекулы в сыворотке крови животных со средней и тяжелой степенью тяжести ТСМ по мере хронизации посттравматических процессов. Однако в группе с легкой степенью тяжести ТСМ такой тенденции не наблюдалось. Это свидетельствует о различиях в течении противовоспалительных реакций при ТСМ легкой степени тяжести при сравнении со средней и тяжелой.

Секреция хемокинов RANTES и MCP-1, ответственных за привлечение иммунных клеток в очаг воспаления, была значительно повышена после ТСМ, демонстрируя динамику, зависящую от степени тяжести повреждения и посттравматического периода.

Наблюдалось постепенное повышение содержания вышеназванных хемокинов в группе с тяжелой степенью повреждения от острого к подострому периоду, что может приводить к лавинообразному увеличению миграции периферических макрофагов и возможно связан с более низкой сохранностью гемато-спинно-мозгового барьера.

Проведенное исследование продемонстрировало, что секреция различных про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови крыс с контузионной ТСМ значительно изменяется в зависимости от тяжести повреждения и посттравматического периода. Полученные результаты подчеркивают важность дальнейших исследований для детального изучения роли цитокинов в патогенезе ТСМ и для разработки эффективных терапевтических стратегий, направленных на модуляцию воспалительного ответа после травмы спинного мозга.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00348, <https://rscf.ru/en/project/23-24-00348/>.

Наумов В.Д.¹ ✉, Слотвицкий М.М.^{1–3}, Цвелая В.А.^{1–3}, Агладзе К.И.^{1,2}

Разработка алгоритма подбора параметров модели человеческой сердечной ткани

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский университет ИТМО, Москва, Россия

✉ v2802@ya.ru

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания являются ведущей причиной смертности в развитых странах. Моделирование сердечной ткани с учетом морфологии клеток — важная задача в здравоохранении. Данная работа посвящена созданию алгоритма для подбора параметров математической модели сердечной ткани, позволяющего реалистично воспроизводить морфологию клеток кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека. В работе были измерены основные морфологические метрики клеток, полученных из экспериментов и моделирования, разработаны алгоритмы для анализа данных и установлены зависимости метрик от параметров модели. В дальнейшем планируется автоматизировать процесс калибровки модели для индивидуального подбора параметров для каждого пациента.

Ключевые слова: сердечно-сосудистые заболевания; клеточные модели; ИПСК.

Naumov V.D.¹, Slotvitsky M.M.^{1–3}, Tselaya V.A.^{1–3}, Agladze K.I.^{1,2}

Development of an algorithm for selecting parameters for a model of human cardiac tissue

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

³ ITMO University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Cardiovascular diseases are the leading cause of death in developed countries. Modeling cardiac tissue based on cell morphology is an important task in healthcare. This work is devoted to the creation of an algorithm for selecting the parameters of a mathematical model of cardiac tissue, which makes it possible to realistically reproduce the morphology of cardiomyocyte cells obtained from human iPSCs. The work measured the basic morphological metrics of cells obtained from experiments and simulations, developed algorithms for data analysis, and established the dependence of the metrics on the model parameters. In the future, it is planned to automate the model calibration process for individual selection of parameters for each patient.

Keywords: cardiovascular diseases; cell models; iPSC.

Согласно исследованиям Всемирной организации здравоохранения, сердечно-сосудистые заболевания являются наиболее распространенной причиной смертности среди трудоспособного населения развитых стран [1, 2]. Наибольшую опасность представляют желудочковые фибрилляции, приводящие к смерти от остановки сердца. Прогнозирование и оценка риска возникновения волн-реентри является актуальной задачей для современного здравоохранения.

Ранее в лаборатории возбудимых систем МФТИ была создана математическая модель сердечной ткани желудочка, учитывающая морфологию ткани и клеток. В ее основу легла клеточная модель Поттса, использующая метод Монте-Карло, варьирование гамильтониана, подобранного по результатам экспериментов, проведенных в лаборатории [3].

Целью работы является создание алгоритма подбора параметров данной модели, достоверно реализующих морфологию как отдельных клеток, так и ткани кардиомиоцитов, полученных из ИПСК человека. Для этого были выбраны и измерены основные метрики, связанные с морфологией клеток (площадь, площадь описанного многоугольника, длина, ширина, удлинение). Снимки с конфокального микроскопа были обработаны в программе ImageJ. Написаны алгоритмы, измеряющие данные метрики на массивах, полученных в результате моделирования. Обработка производилась с помощью библиотек scikit-image и feret, написанных на языке Python. Были составлены таблицы данных: экспериментальные и полученные моделированием. Были проверены и подтвердились несколько гипотез о зависимости метрик от параметров модели. Планируется изучить влияние остальных параметров на данные метрики и реализовать алгоритм, использующий современные методы, для поиска параметров модели, который сможет достоверно реализовывать морфологию сердечной ткани конкретного пациента — то есть автоматизировать процесс калибровки модели и сделать её пациент-специфичной.

Список литературы

1. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015 // *Lancet*. 2016. Vol. 388, N 10053. P. 1459–1544. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31012-1
2. Roth G.A., Huffman M.D., Moran A.E., et al. Global and regional patterns in cardiovascular mortality from 1990 to 2013 // *Circulation*. 2015. Vol. 132, N 17. P. 1667–1678. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008720
3. Kudryashova N., Nizamieva A., Tsvelaya V., et al. Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells // *PLoS Comput Biol*. 2019. Vol. 15, N. 3. ID e1006597. doi: 10.1371/journal.pcbi.1006597

Нащекина Ю.А.^{1,2} ✉, Чабина А.С.¹, Консон В.А.¹, Нашекин А.В.², Михайлова Н.А.¹

Коллагеновые гели с разной степенью жесткости для задач тканевой инженерии

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия

✉ nashchekina.yu@mail.ru

Аннотация. В работе описываются методы формирования и исследования гелей на основе коллагена I типа и карбоксиметилцеллюлозы с разной степенью жесткости. Было показано, что добавление 5% карбоксиметилцеллюлозы в состав коллагенового геля приводит к увеличению жесткости геля и повышению пролиферации клеток.

Ключевые слова: коллагеновый гель; карбоксиметилцеллюлоза; жесткость; мезенхимные стромальные клетки.

Nashchekina Yu.A.¹, Chabina A.S.¹, Konson V.A.¹, Nashchekin A.V.², Mikhailova N.A.¹

Collagen gels with various degrees of stiffness for tissue engineering tasks

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Ioffe Institute RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The abstract describes methods for the formation and study of gels based on type I collagen and carboxymethylcellulose with varying degrees of rigidity. It was shown that the addition of 5% carboxymethylcellulose to the collagen gel leads to an increase in gel rigidity and increasing cell proliferation.

Keywords: collagen gel; carboxymethyl cellulose; stiffness; mesenchymal stem cells.

Коллагеновые гели находят широкое применение в клеточной биологии как аналог внеклеточного матрикса для культивируемых *in vitro* клеток, а также в регенеративной медицине для восстановления ран различной степени тяжести и этиологии. Коллаген I типа является одним из основных белков внеклеточного матрикса соединительной ткани, поэтому гели на его основе являются биосовместимыми носителями для трансплантируемых клеток. Варьируя условия получения можно получать гели различной формы и размера в зависимости от места трансплантации и размера раны. Несмотря на биосовместимость и легкость в использовании таких гелей, существуют и некоторые недостатки, которые ограничивают применение таких гелей как в клеточной биологии в качестве 3D-моделей внеклеточного матрикса, так и при трансплантации в поврежденную ткань. Эти недостатки обусловлены, прежде всего, недостаточными механическими свойствами коллагеновых гелей, а также низкой стабильностью в процессе культивирования клеток. В организме клетки в окружении внеклеточного матрикса находятся в постоянном механическом напряжении, которое оказывает на них белки внеклеточного матрикса. Слабое механическое напряжение или практически его отсутствие *in vitro* приводит к тому, что клетки контрактируют или сжимают гель. В результате такой контракции нарушаются функциональные свойства клеток, что, в конечном итоге, приводит к апоптозу клеток. Увеличить жесткость гелей можно за счет обработки их сшивающими агентами, однако, как правило, все сшивающие агенты в разной степени оказывают цитотоксическое действие на клетки. Также получить более жесткие коллагеновые гели можно путем их смешивания с другими биосовместимыми полимерами. Одним из таких полимеров является карбоксиметилцеллюлоза — биосовместимый полимер, который

уже хорошо себя зарекомендовал в фармацевтической промышленности как безопасный наполнитель для лекарственных препаратов.

Целью настоящего исследования является получение гибридных биосовместимых гелей на основе коллагена I типа и карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) с разной степенью жесткости и оценка влияния состава гибридного гидрогеля на свойства мезенхимных стромальных клеток человека (МСК).

В процессе выполнения исследования методами УФ-спектроскопии, ИК-спектроскопии, а также сканирующей электронной микроскопии было продемонстрировано, что добавление 5% КМЦ в состав коллагенового геля не влияет на процесс фибриллообразования, а также на структуру и нативность коллагеновых фибрилл. Добавление 10 и 15% КМЦ в состав коллагенового геля препятствует процессу фибриллообразования. В данных образцах коллагеновые фибриллы с нативной морфологией обнаружены не были. При оценке механических свойств гибридных гидрогелей была выявлена прямолинейная зависимость увеличения жесткости гидрогелей от количества добавленной КМЦ. Оценка миграционной активности МСК на полученных гидрогелях продемонстрировала значительное увеличение скорости миграции клеток на гибридных гидрогелях с 5% КМЦ по сравнению с немодифицированным коллагеновым гелем. Также было показано, что при длительном культивировании МСК в течение 3 недель контракция гелей с КМЦ существенно ниже по сравнению с коллагеновыми гелями без модификации. Увеличение адгезии и пролиферации МСК на длительных сроках культивирования в гибридных коллагеновых гелях с 5% КМЦ подтверждает перспективность их использования в качестве тканеинженерных конструкций для восстановления поврежденных органов и тканей.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20120).

Неганова И.Э. ✉, Гурский В.

Анализ индуцированных плюрипотентных стволовых клеток с использованием методов глубокого обучения; перспектива выбора лучшего клона для целей регенеративной медицины

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ irina.neganova@incras.ru

Аннотация. Применение пациент-специфичных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) имеет большие перспективы для развития персонализированной медицины. От одного пациента можно получить более 10 клонов ИПСК, но не все из них способны к направленной дифференцировке с одинаковой эффективностью. В связи с этим выбор «лучшего» клона ИПСК очень важен, однако это остается сложной задачей. В настоящее время отбор лучших клонов осуществляется на основе их морфологических особенностей, как неинвазивный метод исследования. Используя методы математического анализа и глубокого машинного обучения, мы показали принципиальную возможность выбора лучшего клона с точностью 89% на основе всего лишь двух-трех морфологических признаков колоний ИПСК. Далее мы обсудим, как морфологические характеристики различных клонов ИПСК, так называемый их морфологический портрет, согласуются с их протеомным ландшафтом и определяются организацией цитоскелета. Наконец, мы предложим дальнейшие направления в этой области исследований.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные клетки человека; машинное обучение; выбор клона; протеом; морфологический фенотип; цитоскелет.

Neganova I., Gursky V.

Analysis of the human induced pluripotent stem cells using deep learning methods; the prospect of the best clone selection for purpose of Regenerative medicine

Institute of Cytology, RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The application of patient-specific human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) has a great perspective for the development of personalized medicine. More than 10 hiPSCs clones can be generated from one patient but not all of them are able to undergo directed differentiation with the same efficiency. Therefore, the selection of the “best” or “true” hiPSC clone is very important, but this remains a challenge. Currently, selection of the best clones is based on their morphological characteristics. Using methods of mathematical analysis and deep machine learning, we showed the fundamental possibility for selecting the best clone with 89% accuracy based on only two to three morphological features. Next, we will discuss on how the morphological characteristics of various hiPSCs clones, the so-called “morphological portrait,” are reflected by their proteome and determined by cytoskeletal organization. Finally, we will suggest further directions in this research area.

Keywords: hiPSCs; machine learning; best clone; proteome; morphological phenotype; cytoskeleton.

При работе с индуцированными стволовыми клетками человека (ИПСК) поддержание клеточных культур и выбор лучших клонов основано на прижизненной морфологической оценке колоний, как на неинвазивном методе. Однако до сих пор не был проведен систематический анализ морфологических признаков разных линий ИПСК и эмбриональных стволовых клеток человека (ЭСК). Как широко могут варьировать морфологические показатели, какие из них достоверно могут быть применены к оценке клеточных культур,

как морфологические признаки связаны с экспрессией тех или иных плюрипотентных маркеров изучено крайне слабо.

В связи с этим возникает ряд фундаментальных вопросов: 1. Какие морфологические признаки характеризуют лучший клон и как широко они могут варьировать в разных линиях? 2. Какие морфологические признаки позволяют провести селекцию лучшего клона и как они связаны с экспрессией плюрипотентных генов и маркеров дифференцировки? 3. Чем обоснованы морфологические различия, определяющие «хороший» или «плохой» морфологический фенотип?

Мы используем междисциплинарный подход — создание математической модели (ММ), описывающей рост, развитие плюрипотентной колонии и ее миграцию, в зависимости от выбранной среды культивирования и субстрата. Такая ММ включает в себя морфологический портрет «истинных» колоний ПКЧ, связь морфологических признаков с плюрипотентными характеристиками, клеточную миграцию, а также данные анализа протеома ИПКЧ в соответствие с их морфологическими портретами.

С помощью методов машинного обучения и методов оценки важности параметров в ММ были выделены минимальные наборы параметров, комбинация которых («морфологический портрет») является максимально информативной для предсказания плюрипотентного статуса колонии по морфологическим характеристикам. Модели классификации фенотипа и клональности по экспрессии плюрипотентных генов со 100% точностью предсказывают фенотип и клональность по экспрессии всего четырёх генов (*SALL4*, *NANOG*, *REX1*, *SOX 2*).

В результате анализа экспрессии 14 генов дифференцировки эмбриональных тел показано, что всего двух генов достаточно (*SOX1* и *CDX2*) как предикторов для построения модели классификации, в которой клональность образца предсказывается по экспрессии этих генов с точностью 91%. Кроме того, созданы модели классификации фенотипа по изображениям колоний. Проведено обучение нейронной сети на расширенном наборе данных. Результаты позволяют сделать вывод о работоспособности построенного классификатора для изображений, полученных в различных экспериментальных условиях.

Результаты панорамного протеомного анализа показали существенную роль КАЛЬПОНИН 3 (*CALPONIN3/CNN3*) в определении хорошего морфологического фенотипа у ЭСК и ЭЗРИНА (*EZRIN/EZR*) в определении хорошего морфологического портрета у ИПСК. Впервые получены данные о содержании белков *EZRIN* и *CALPONIN-3* в различных типах плюрипотентных стволовых клеток человека, отличающихся по своим морфологическим характеристикам при культивировании в двух средах (*mTESR1* vs *Essential E8*) с соответствующими матриксами (*Matrigel* vs *GelTrex*). Модель Орнштейна–Уленбека была использована для описания миграции колоний. Колонии с хорошим и плохим фенотипом различаются по значениям модельных параметров миграции. В частности, колонии с плохим морфологическим фенотипом демонстрируют более высокие значения коэффициента диффузии по сравнению с хорошим фенотипом, что соответствует результатам о большей мобильности колоний с плохим фенотипом. Таким образом, полученная модель миграции с может использоваться для классификации фенотипа по параметрам миграции.

Полученные Модели классификации фенотипа могут использоваться для дальнейшей интеграции в автоматические системы контроля качества колоний ИПСК, что сделает процесс выбора лучшего клона более надежным для целей регенеративной медицины.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 21-75-20132 И. Негановой.

Список литературы

1. Vedeneeva E., Gursky V., Samsonova M., et al. Morphological signal processing for phenotype recognition of human pluripotent stem cells using machine learning methods // *Biomedicines*. 2023. Vol. 11, N 11. P. 3005. doi: 10.3390/biomedicines11113005
2. Mamaeva A., Krasnova O., Khvorova I., et al. Quality control of human pluripotent stem cell colonies by computational image analysis using convolutional neural networks // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 1. P. 140. doi: 10.3390/ijms24010140
3. Krasnova O.A., Gursky V.V., Chabina A.S., et al. Prognostic analysis of human pluripotent stem cells based on their morphological portrait and expression of pluripotent markers // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 21. P. 12902. doi: 10.3390/ijms232112902

Низяева Н.В.¹✉, Сухачева Т.В.¹, Милованов А.П.¹, Фокина Т.В.¹, Пацаев Т.Д.², Деев Р.В.¹

Многоядерные гигантские клетки трофобласта в миометрии пациенток при вращении плаценты

¹ НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ nizyaeva@gmail.com

Аннотация. Эпителиальный фенотип многоядерных гигантских клеток трофобласта (МГТК) при вращении плаценты подтвержден положительным окрашиванием цитокератина 8 отсутствием окрашивания CD68. Ультраструктурная морфология МГТК свидетельствует об их высокой синтетической активности и способности к инвазии и миграции.

Ключевые слова: многоядерные гигантские клетки трофобласта; приращение плаценты.

Nizyaeva N.V.¹, Sukhacheva T.V.¹, Milovanov A.P.¹, Fokina T.V.¹, Patsaev T.D.², Deev R.V.¹

Multinucleate trophoblastic giant cell in the myometrium of patients in cases of placenta accreta

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

² National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. The epithelial phenotype of multinucleated giant trophoblast cells (MGTC) in placenta accreta is confirmed by positive cytokeratin 8 staining and absence of CD68 staining. Ultrastructural morphology of MGTC indicates high synthetic activity and the ability to invade and migrate.

Keywords: multinucleated trophoblast giant cells; placenta accreta spectrum.

Введение. Многоядерные гигантские трофобластические клетки (МГТК) описаны в области инвазии плацентарных ворсин в миометрий и обычно их появление было связано с остановкой инвазии и имеют признаки инволюции [1–4].

Целью исследования было выявление и описание особенностей ультраструктурной морфологии и иммуногистохимического фенотипа МГТК.

Методы. Изучены образцы миометрия 19 пациенток (28–42 года, 32–38 недель беременности) с диагнозом вращение плаценты. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином, а также было проведено иммуногистохимическое исследование с первичными антителами к цитокератину 8 и CD68. Образцы также были изучены посредством трансмиссионного электронного микроскопа.

Результаты. На границе децидуальной оболочки и гладких мышечных клеток миометрия были зарегистрированы МГТК диаметром $14,2 \pm 3,3$ мкм. МГТК окрашивались положительно цитокератином 8 и отрицательно CD68. Электронно-микроскопическое исследование выявило несколько крупных, неправильной формы ядер в МГТК и значительное количество цистерн гранулярного эндоплазматического ретикула, расположенных параллельными рядами, что свидетельствует о выраженной синтетической активности этих клеток. В цитоплазме также были обнаружены структуры комплекса Гольджи, множественные митохондрии, тонкие нити и липидные включения. Множественные инвагинации и цитоплазматические выступы — микроворсинки располагались по всему периметру клетки. Ультраструктура МГТК подтверждала высокую синтетическую активность данных клеток, а также способности к инвазии и миграции, что несколько опровергало представление о данных клетках как об инволютивном типе. Сарколема МГТК часто была

окружена своего рода базальной мембраной, аморфным электронно-плотным материалом. Есть мнение, что МГТК скорее всего отражают преждевременное слияние вневорсинчатого трофобласта из-за нескольких факторов, включая, вероятно, также гипоксию, являющуюся ключевым патогенетическим фактором [5].

Заключение. Таким образом, область инвазии плаценты в матку у пациенток с приросшей плацентой характеризуется накоплением полиморфных МГТК. Эпителиальный фенотип МГТК подтвержден иммуногистохимией. Ультраструктурная морфология МГТК свидетельствует о способности к инвазии и миграции в матке.

Список литературы

1. van Beekhuizen H.J., Joosten I., de Groot A.N., et al. The number of multinucleated trophoblastic giant cells in the basal decidua is decreased in retained placenta // *J Clin Pathol*. 2009. Vol. 62, N 9. P. 794–797. doi: 10.1136/jcp.2009.065953
2. Jones C.J.P., Aplin J.D. A re-examination of the origins of placental bed giant cells // *Placenta*. 2021. Vol. 114. P. 39–41. doi: 10.1016/j.placenta.2021.08.053
3. Morey R., Farah O., Kallol S., et al. Transcriptomic drivers of differentiation, maturation, and polyploidy in human extravillous trophoblast // *Front Cell Dev Biol*. 2023. Vol. 11. doi: 10.3389/fcell.2023.1189745. Corrected and republished from: *Front Cell Dev Biol*. 2021. Vol. 9. doi: 10.3389/fcell.2021.702046.
4. Hannon T., Innes B.A., Lash G.E., et al. Effects of local decidua on trophoblast invasion and spiral artery remodeling in focal placenta creta — an immunohistochemical study // *Placenta*. 2012. Vol. 33, N 12. P. 998–1004. doi: 10.1016/j.placenta.2012.09.004
5. Stanek J., Biesiada J. Sensitivity and specificity of finding of multinucleate trophoblastic giant cells in decidua in placentas from high-risk pregnancies // *Hum Pathol*. 2012. Vol. 43, N 2. P. 261–268. doi: 10.1016/j.humpath.2011.03.012

Никитина Т.В.¹✉, Карагяур М.Н.^{1,2}, Потапова А.Ю.³, Макаревич П.И.^{1,2}, Еремичев Р.Ю.^{1,2}

Создание immortalized линии мезенхимальных стромальных клеток эндометрия человека с гиперэкспрессией эстрогенового рецептора альфа

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

² Институт регенеративной медицины, МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Россия, Москва

³ Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ nikitinamide@gmail.com

Аннотация. Для изучения механизмов эстроген-индуцированного роста эндометрия нами была отработана мышиная модель данного процесса и получена линия immortalized мезенхимальных стромальных клеток эндометрия человека с гиперэкспрессией ESR1.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки эндометрия человека; 17-β-эстрадиол; эстрогеновый рецептор альфа.

Nikitina T.V.¹, Karagyaur M.N.^{1,2}, Potapova A.Yu.³, Makarevich P.I.^{1,2}, Eremichev R.Yu.^{1,2}

Generation of immortalized line of human endometrial mesenchymal stromal cells with overexpression of estrogen receptor alpha

¹ Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University Medical Centre, Moscow, Russia

³ Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. To study the mechanisms of estrogen-induced endometrial growth, we established a mouse model of this process and obtained the line of immortalized human endometrial mesenchymal stromal cells with overexpression of ESR1.

Keywords: human endometrial mesenchymal stromal cells; 17-β-estradiol; estrogen receptor alpha.

Изучение клеточных и молекулярных механизмов обновления эндометрия человека — перспективное направление исследований в регенеративной медицине [1]. Известно, что активация эстрогенового рецептора альфа (ESR1) необходима для роста эндометрия именно в стромальных, а не в эпителиальных клетках [1–3]. Также установлено, что стромальные клетки являются активными продуцентами регуляторных факторов, действующих как на сами клетки стромы (аутокринно), так и на другие типы клеток (паракринно). В связи с этим для дальнейшего раскрытия механизмов эстроген-индуцированного роста эндометрия обоснованным подходом является поиск регуляторных молекул, продуцируемых стромальными клетками при активации в них ESR1.

Возможность выполнения необходимых экспериментов *in vitro* ограничивает феномен значительного падения экспрессии ESR1 в клеточных культурах мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (МСКЭ), а использование других культур не представляется приемлемым ввиду высокой тканеспецифичности исследуемого процесса. Для решения этой проблемы нами была проведена лентивирусная трансдукция immortalized мезенхимальных стромальных клеток эндометрия (hTERT МСКЭ) человека. Данная линия была ранее получена нами путем доставки гена теломеразы (*hTERT*) в соответствующую первичную культуру. Нарботка лентивирусных векторов, содержащих ген *ESR1*, осуществлялась с помощью трансфекции

линии-продуцента HEK293T смесью плазмид. Полученные векторы использовались для трансдукции hTERT МСКЭ, в результате чего были получены две клеточные линии с гиперэкспрессией ESR1. Линии культивировались в течение 7 пассажей, при этом стабильно пролиферировали и сохраняли характерную для МСКЭ фибробластоподобную морфологию.

Гиперэкспрессия ESR1 в целевых клеточных линиях была подтверждена методом RT-qPCR после выделения из клеток тотальной РНК с помощью фенол-хлороформной экстракции. Экспрессия ESR1 в полученных клеточных линиях выросла в 11 и 17 раз соответственно в сравнении с контрольными нетрансдуцированными hTERT МСКЭ. Созданные линии будут использованы для дальнейших исследований механизмов эстроген-индуцированного роста эндометрия.

В связи с необходимостью дальнейших экспериментов на животных нами также была отработана мышиная модель эстроген-индуцированного роста эндометрия, на которой была показана чувствительность овариэктомированных мышей к экзогенному введению 17- β -эстрадиола (E2). Для нивелирования влияния эндогенных эстрогенов мышам проводили овариэктомию с помощью метода одиночного дорзального разреза, после чего 2 недели они находились в постоперационном покое. E2 вводился животным при помощи подкожных инъекций в дозировках 1000 нг, 500 нг, 250 нг и 125 нг в день в течение трех дней. На всех экспериментальных животных ($n = 2$ для каждой дозировки E2) было продемонстрировано увеличение размеров эндометрия в сравнении с контрольными овариэктомированными мышами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 19-75-30007(п).

Список литературы

1. Winuthayanon W., Lierz S.L., Delarosa K.C., et al. Juxtacrine activity of estrogen receptor α in uterine stromal cells is necessary for estrogen-induced epithelial cell proliferation // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, N 1. P. 8377. doi: 10.1038/s41598-017-07728-1
2. Winuthayanon W., Hewitt S.C., Orvis G.D., et al. Uterine epithelial estrogen receptor α is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010. Vol. 107, N 45. P. 19272–19277. doi: 10.1073/pnas.1013226107
3. Tamama K., Barbeau D.J. Early growth response genes signaling supports strong paracrine capability of mesenchymal stem cells // *Stem Cells International*. 2012. Vol. 2012, N 1. ID 428403. doi: 10.1155/2012/428403

Никишин Д.А.^{1,2} ✉

Проблема истощаемости овариального резерва: биологические причины и методические подходы к решению

¹ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

✉ denisnikishin@gmail.com

Аннотация. Овариальный резерв женщины формируется в эмбриональном периоде и уменьшается всю жизнь. На скорость его сокращения влияют эндогенные механизмы и внешние факторы, а восстановить его невозможно. Наиболее точными методами оценки остаются инвазивные прямые методы оценки количества фолликулов.

Ключевые слова: овариальный резерв; ооцит; атрезия; преждевременная недостаточность яичников (POI); фолликулогенез; репродуктивное здоровье; генетические факторы; диагностика.

Nikishin D.A.^{1,2}

The problem of ovarian reserve depletion: biological causes and methodological approaches

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, Russia

Abstract. The ovarian reserve of a woman is formed during the embryonic period and decreases throughout life. The rate of its decline is influenced by endogenous mechanisms and external factors, and it cannot be restored. The most accurate methods of assessment remain invasive direct methods for evaluating the number of follicles.

Keywords: ovarian reserve; oocyte; atresia; premature ovarian insufficiency (POI); folliculogenesis; reproductive health; genetic factors; diagnosis.

Запас покоящихся яйцеклеток, готовых к созреванию, составляющий овариальный резерв женщины, формируется ещё в эмбриональном периоде и непрерывно уменьшается в течение жизни. Исчерпаемость овариального ресурса у женщин биологически обусловлена несколькими причинами.

1. Формирование овариального резерва происходит в ходе эмбрионального развития девочки. Этот процесс ограничен во времени и полностью завершается к моменту рождения, после чего количество фолликулов в яичниках не увеличивается. Таким образом, изначально заложенный запас клеток будет использоваться на протяжении всей репродуктивной жизни женщины.

2. Ещё во время внутриутробного развития и после рождения происходит массовая запрограммированная гибель (апоптоз) ооцитов, контролируемая генетическими и молекулярными механизмами. Кроме того, важным фактором является атрезия — процесс дегенерации, которому подвержены фолликулы на различных стадиях их развития. В процессе атрезии погибают как примордиальные фолликулы, так и те, которые уже начали созревать. Сотни тысяч первичных ооцитов и примордиальных фолликулов, заложенных в яичниках, подвергаются апоптозу, и лишь небольшая их часть достигает стадии зрелости. Этот процесс существенно способствует уменьшению овариального резерва.

3. В течение жизни женщины постоянно происходит спонтанный выход фолликулов из резерва и их переход в стадию созревания. Этот процесс происходит независимо от гормональных циклов и продолжается даже в те периоды, когда на гормональном уровне функции яичников подавлены, например, во время беременности или при применении контрацептивов.

4. Ооциты обладают высокой чувствительностью к различным внешним факторам, таким как радиация, химические вещества, курение, инфекции и т.д. Эти факторы могут вызывать повреждения или гибель ооцитов, что в совокупности также способствует ускоренному исчерпанию овариального ресурса.

5. В организме женщины отсутствуют стволовые клетки, которые могли бы восстанавливать овариальный резерв. Следовательно, клетки, утраченные по любым причинам, не подлежат восполнению, что неизбежно ведет к постепенному исчерпанию овариального резерва с возрастом.

Таким образом, исчерпаемость овариального резерва — это многофакторное явление, обусловленное как генетическими и физиологическими механизмами, так и воздействием внешних факторов. Понимание этих процессов имеет ключевое значение для разработки стратегий, направленных на сохранение репродуктивного здоровья женщин. Одним из ярких проявлений данной проблемы является синдром преждевременной недостаточности яичников (POI). Обычно овариальный резерв сохраняется на достаточном уровне до менопаузы, наступающей около 45 лет. Однако различные факторы могут вызывать преждевременное снижение овариального резерва, в результате чего функция яичников и менструации прекращаются до 40 лет. У женщин с POI наблюдаются сниженные уровни эстрогенов, прогестерона и тестостерона, и одновременно — высокие уровни фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), что характерно для менопаузы. Синдром может быть ассоциирован с рядом заболеваний, таких как аутоиммунный полиэндокринный синдром, врожденная гиперплазия надпочечников, синдром ломкой X-хромосомы, синдром Блума, синдром Тернера и др. Провоцирующими факторами также могут быть химиотерапия, лучевая терапия, хирургические вмешательства и вирусные инфекции. Тем не менее, в большинстве случаев причина POI остаётся неустановленной.

Для оценки состояния овариального резерва и диагностики POI на сегодняшний день наиболее широко применяются подходы, основанные на оценке показателей, отражающих интенсивность овариального фолликулогенеза, которые очень косвенно отражают состояние овариального резерва. Эффективных неинвазивных методов, которые позволили бы напрямую оценить величину овариального запаса в яичнике, не существует. В свете вышеописанного, разработки новых технологий оценки овариального резерва являются важным направлением научных исследований. Для этого проводятся исследования на различных моделях, включая мышей. Один из наиболее точных методов оценки овариального резерва — гистологическое исследование с подсчётом фолликулов на срезах. Однако у этого метода есть ряд весомых недостатков, такие как значительная трудоемкость и сравнительно низкая воспроизводимость и невозможность дальнейшего исследования ткани иными методами. Современной альтернативой может стать применение молекулярно-генетической оценки овариального резерва с помощью количественной оценки уровня экспрессии ооцитарных маркеров методом ПЦР в реальном времени. На мышинных моделях возрастного и экспериментального истощения овариального резерва метод демонстрирует высокий коэффициент корреляции с морфологическим подходом и более высокие показатели точности и воспроизводимости. В дальнейшем новые методы потенциально способны улучшить диагностику и лечение женщин, страдающих от преждевременной недостаточности яичников, что может существенно повысить их качество жизни и решить многие проблемы, связанные с бесплодием.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 22-74-10009.

Новикова А.А.¹✉, Иванова В.О.², Кирпичева А.С.¹, Першин В.И.¹, Мухина И.В.¹

Оценка функциональной активности гидрогеля на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса головного мозга свиньи в условиях *in vivo*

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

² НИНГУ имени Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

✉ novikoova3002@mail.ru

Аннотация. Исследовали влияние оригинального гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга свиньи на формирование глиального рубца и восстановление ткани мозга в области черепно-мозговой травмы у мышей. Исследуемый биоматериал является перспективным в тканезаместительной терапии.

Ключевые слова: децеллюлированный матрикс; нейротрансплантат; глиальный рубец; черепно-мозговая травма.

Novikova A.A.¹, Ivanova V.O.², Kirpicheva A.S.¹, Pershin V.I.¹, Mukhina I.V.¹

Evaluation of the functional activity of a hydrogel based on decellularized extracellular matrix of the pig brain *in vivo*

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Lobachevsky University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. The effect of the original hydrogel based on the decellulated matrix of the pig brain on the formation of a glial scar and the restoration of brain tissue in the area of traumatic brain injury in mice was studied. The results. Biomaterial under study is promising in tissue replacement therapy.

Keywords: decellularized matrix; neurotransplant; glial scar; traumatic brain injury.

Мировая статистика свидетельствует о непрерывном росте травм мозга и их последствий. Сохранение поведенческих и когнитивных нарушений после острой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) является свидетельством неспособности человеческого мозга восполнить утраченную ткань. Регенерация ткани головного мозга остается одной из самых больших нерешенных проблем в медицине и многими считается неосуществимой. Повреждение нервной ткани в следствие травмы приводит к множеству патофизиологических процессов, в частности, активации и пролиферации астроцитов, которые мигрируют в очаг поражения, и совместно с другими клетками образуют рубцовую структуру, препятствующую восстановлению аксонов и создающую неблагоприятную среду для регенерации нервной ткани [1]. Потенциальным решением проблемы может стать нейротрансплантат на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса (ВКМ) головного мозга.

Целью исследования являлась оценка влияния гидрогеля на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса (дцВКМ) головного мозга свиньи на плотность астроцитов и нейронов в области поврежденной ткани мозга мышей линии C57Bl/6 при моделировании ЧМТ.

Моделирование открытой тяжелой ЧМТ проводилось «weight-drop» способом по оригинальной методике [2]. Через 7 дней после ЧМТ в область трепанации в зависимости от группы вводили методом инъекции либо PBS, либо раствор коллагена Viscoll, либо исследуемый гидрогель на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса свиньи, либо сочетанное применение раствора коллагена Viscoll + гидрогель на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса. По прошествии 7 и 30 дней были сделаны срезы

головного мозга мышей всех экспериментальных групп и их иммуногистохимическое окрашивание с применением технологии тирамидной амплификации сигнала с последующим анализом плотности GFAP⁺-клеток (GFAP — маркер астроцитов) и изменения соотношения плотности фенотипов нейрональной дифференцировки (Nestin — маркер нейробластов, Doublecortin — маркер молодых нейронов, MAP2 — маркер зрелых нейронов).

В результате было выявлено, что гидрогель на основе дцВКМ мозга свиньи снижает плотность астроцитарных клеток спустя 7 и 30 дней после введения в область травмы по сравнению с контрольными группами и препаратом на основе коллагена I типа Viscoll и способствует миграции нейрональных прогениторов в область травмы мозга и их дальнейшей пролиферации через 30 дней после инъекции в область травмы.

Полученные данные позволяют оценить перспективу использования нейротрансплантата на основе децеллюлированного матрикса мозга в тканезаместительной терапии травмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 121030100282-6.

Список литературы

1. Ng Y.S., Lee A.Y. Traumatic brain injuries: pathophysiology and potential therapeutic targets // *Front Cell Neurosci.* 2019. Vol. 13. P. 528. doi: 10.3389/fncel.2019.00528
2. Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Gladkov A.A., et al. Transplantation of neural progenitor cells in hyaluronic hydrogel in traumatic brain injury in experiment // *Modern Technologies in Medicine.* 2017. Vol. 9, N 4. P. 106–114. EDN: YMQNRN doi: 10.17691/stm2017.9.4.13

Новикова В.Д.¹✉, Вахрушев И.В.¹, Басок Ю.Б.², Баскаев К.К.¹, Леонов Г.Е.¹, Григорьев А.М.²,
Белова А.Д.², Кирсанова Л.А.², Лупатов А.Ю.¹, Бурунова В.В.¹, Ковалёв А.В.³,
Макаревич П.И.⁴, Севастьянов В.И.^{2,5}, Ярыгин К.Н.¹

Выбор оптимального источника МСК для регенеративной терапии заболеваний суставного хряща

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

² Отделение биомедицинских технологий и тканевой инженерии, Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова, Москва, Россия

³ Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

⁴ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт биомедицинских исследований и технологий, Москва, Россия

✉ vnlvikova@gmail.com

Аннотация. Проведен сравнительный анализ экспрессии генов и накопления ВКМ в сфероидах из МСК различного происхождения в процессе хондрогенной дифференцировки. Максимальный прирост транскрипции COL2A1 зафиксирован у МСК пуповины, а наиболее выраженное накопление хрящевого ВКМ — в сфероидах из МСК жировой ткани.

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; хондрогенная дифференцировка; тканевые сфероиды; хондросферы; регенерация хряща.

Novikova V.D.¹, Vakhrushev I.V.¹, Basok Yu.B.², Baskaev K.K.¹, Leonov G.E.¹, Grigoriev A.M.²,
Belova A.D.², Kirsanova L.A.², Lupatov A.Yu.¹, Burunova V.V.¹, Kovalev A.V.³,
Makarevich P.I.⁴, Sevastianov V.I.^{2,5}, Yarygin K.N.¹

Identifying the optimal source of mesenchymal stem cells for articular cartilage regeneration

¹ Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Department for Biomedical Technologies and Tissue Engineering, Shumakov National Medical Research Center of Transplantology and Artificial Organs, Moscow, Russia

³ Priorov Central Institute for Trauma and Orthopedics, Moscow, Russia

⁴ Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Centre, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Institute of Biomedical Research and Technology, Moscow, Russia

Abstract. A comparative analysis of gene expression and ECM accumulation in tissue spheroids derived from MSCs of different origin during chondrogenic differentiation was carried out. A higher increase of COL2A1 transcription was detected in umbilical cord MSC spheroids, while the most pronounced cartilaginous ECM deposition was observed in adipose tissue MSC spheroids.

Keywords: mesenchymal stromal cells; chondrogenic differentiation; tissue spheroids; chondrospheres; cartilage regeneration.

Трансплантация аутологичных хондроцитов является золотым стандартом регенеративной терапии суставного хряща, однако во многих клинических случаях получение клеточных культур хондроцитов может быть затруднено. В качестве альтернативы широко рассматриваются более доступные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК), обладающие, как известно, хондрогенным потенциалом.

Целью настоящей работы был сравнительный анализ изменения профиля транскрипции генов и накопления внеклеточного матрикса, характерного для суставного хряща, в сфероидных культурах МСК из различных источников в процессе их хондрогенной дифференцировки.

Источниками первичных культур МСК послужили вартонов студень пуповины (МСК ВСП), подкожная жировая ткань (МСК ЖТ) и пульпа молочного зуба (МСК ПЗ). В качестве положительного контроля выступали первичные хондроциты.

Клеточные сфероиды, полученные путем агрегации клеток в низкоадгезивных планшетах, культивировали в хондрогенной среде на основе TGF- β 1 в течение трёх недель.

Было обнаружено, что сам перевод клеток из двумерной культуры в сфероиды уже приводил к активации некоторых маркерных генов хондрогенеза, а именно ACAN и SOX9. В ответ на последующее культивирование сфероидов в присутствии TGF- β 1 во всех типах МСК существенно возрастал уровень транскрипции COL2A1 (маркер гиалинового хряща), в то время как экспрессия COL1A1 (маркер волокнистого хряща) в большинстве случаев снижалась либо росла незначительно. Максимальный прирост уровня транскрипции COL2A1 под действием TGF- β 1 был зафиксирован в МСК ВСП, в то время как накопление хрящевого ВКМ наиболее явно наблюдалось в сфероидах из МСК ЖТ.

На основании полученных данных можно сделать вывод о практической пригодности МСК ВСП наравне с МСК ЖТ для тканевой инженерии суставного хряща.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Норкин Р.Р. ✉, Хусаинова Л.А., Яныгина Л.М., Ризванов А.А., Пономарев А.С.

Оценка эффективности и безопасности генетических подходов, направленных на восстановление уровня трансглутаминазы 1 *in vitro*

Казанский федеральный университет, Казань, Россия

✉ rnorkin@kpfu.ru

Аннотация. Применение генетических подходов, направленных на коррекцию гена, кодирующего фермент TGM1, может стать перспективным направлением в терапии ихтиозов. Было проведено исследование *in vitro* двух методов модификации: трансфекции плазмидным и трансдукции вирусным вектором. Эффективность разработанной конструкции была подтверждена методами ПЦР-РВ, вестерн-блоттинга, был проведен анализ жизнеспособности (аннексин V).

Ключевые слова: ихтиоз; генная терапия; *in vitro*; TGM1; трансфекция; плазмидный вектор; трансдукция; вирусный вектор; подтверждение эффективности; анализ жизнеспособности.

Norkin R.R., Khusainova L.A., Yanygina L.M., Rizvanov A.A., Ponomarev A.S.

Assessment of the effectiveness and safety of genetic approaches aimed at restoring transglutaminase 1 levels *in vitro*

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. The use of genetic approaches aimed at correcting the gene encoding the TGM1 enzyme may become a promising direction in the treatment of ichthyosis. An *in vitro* study was carried out on two modification methods: plasmid transfection and viral vector transduction. The effectiveness of the developed construction was confirmed by RT-PCR, Western blotting, and a viability analysis was performed (Annexin V).

Keywords: ichthyosis; gene therapy; *in vitro*; TGM1; transfection; plasmid vector; transduction; viral vector; confirmation of effectiveness; viability analysis.

Текст тезиса: Ихтиозы, включая ламеллярный ихтиоз (ЛИ), характеризуются нарушением барьерной функции эпидермиса, что приводит к выраженному гиперкератозу, шелушению и воспалению кожи, вызванным недостатком фермента TGM1, обусловленным мутацией гена TGM1. Такие осложнения могут негативно влиять на физическое развитие ребенка, особенно в раннем возрасте, из-за проблем с терморегуляцией. Также повышается вероятность развития кожных суперинфекций и значительной трансэпидермальной потери влаги, что в некоторых случаях может привести к сепсису и угрожать жизни. Применение генетических подходов, направленных на коррекцию гена, кодирующего фермент TGM1, может стать перспективным направлением в терапии данных заболеваний. Исследовались 2 метода модификации: трансфекция плазмидным и трансдукция вирусным вектором. Эксперименты проводились на первичных фибробластах человека и клеточных культурах HEK293T для анализа экспрессии гена и белка. Эффективность разработанной конструкции была подтверждена методами ПЦР-РВ, вестерн-блоттинга и анализа жизнеспособности (Аннексин V). Клеточные культуры фибробластов и HEK293T после модификации плазмидой pAAV2-TGM1 содержали $1,6 \times 10^{12}$ копий гена и $2,59 \times 10^{11}$ копий гена TGM1 на 1 мкг тотальной РНК (тРНК) соответственно. После трансдукции вирусом AAV2-TGM1 количество копий гена в фибробластах и HEK293T было $8,25 \times 10^7$ и $2,18 \times 10^6$ копии гена на 1 мкг тРНК соответственно. Белок размером 89 кДа, соответствующий целевому

белку SMN1, детектировался в образцах клеток HEK293T, после трансфекции pAAV-TGM1 и трансдукции AAV2-TGM1, соответственно. При оценке жизнеспособности клеточной культуры HEK293T не наблюдалось различий в контрольной и опытной группе на 3 сутки, а на 7 сутки происходило снижение жизнеспособности на 8% в группе после трансдукции вирусным вектором. Таким образом, было продемонстрировано, что модификация фибробластов и HEK293T методами трансфекции и трансдукции позволяет получать клетки, сверхэкспрессирующие ген *TGM1*. Для оценки эффективности данных методов *in vivo*, требуются дальнейшие исследования.

Ныров В.А. ✉, Смирнова Д.В., Малашичева А.Б.

Влияние регуляции экспрессии *ESRRa* на остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ v.nyrov@incras.ru

Аннотация. Исследование изучает роль *ERRa* в остеогенной дифференцировке мезенхимальных клеток. Результаты показали, что снижение экспрессии *ERRa* подавляет дифференцировку, тогда как повышение его экспрессии не влияет на этот процесс. Ингибирование *ERRa* также подавляет дифференцировку.

Ключевые слова: эстроген-связанный рецептор альфа; остеогенная дифференцировка; РНК-интерференция.

Nyrov V.A., Smirnova D.V., Malashicheva A.B.

The effect of regulation of *ESRRa* expression on osteogenic differentiation of mesenchymal cells

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study examines the role of *ERRa* in osteogenic differentiation of mesenchymal cells. The results showed that a decrease in the expression of *ERRa* suppresses differentiation, whereas an increase in its expression does not affect this process. Inhibition of *ERRa* also suppresses differentiation.

Keywords: estrogen-related receptor alpha; osteogenic differentiation; RNA-interference.

В настоящее время актуальной проблемой здравоохранения являются патологические изменения в опорно-двигательной и сердечно-сосудистой системах. Снижение уровня эстрогена, особенно у женщин после начала менопаузы, может приводить к развитию остеопороза, который затрагивает от 1 до 8% мужчин и от 9 до 38% женщин в развитых странах. Параллельно с этим, патологическая остеогенная дифференцировка интерстициальных клеток аортального клапана, приводящая к кальцификации, встречается значительно чаще у мужчин. Примечательно, что строение кальцифицированных участков у мужчин и женщин отличается. Остеопороз и кальцификация — это два противоположных процесса, которые тесно связаны с нарушением баланса остеогенной дифференцировки. В ряде случаев патологическая остеогенная дифференцировка наминает нормальную дифференцировку остеобластов. Исследования показали, что остеобласты, остециты и остеокласты экспрессируют различные эстрогеновые рецепторы, оказывающие влияние на процессы остеогенной дифференцировки. Однако, помимо них, клетки также экспрессируют близкие по структуре рецепторы, такие как эстроген-связанный рецептор альфа (*ERRa*, NR3B1).

ERRa — это орфанный рецептор, относящийся к группе ядерных рецепторов. Он обладает способностью регулировать экспрессию генов и участвует в регуляции сигнального пути WNT, играющего ключевую роль в развитии костной ткани.

В настоящем исследовании был проведен анализ влияния изменения уровня экспрессии гена *ESRRa*, и регуляции активности рецептора *ERRa*, кодируемого этим геном, на остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения. Регуляция экспрессии гена *ESRRa* осуществлялась двумя методами: повышение экспрессии путём трансдукции лентивирусными частицами, несущими нуклеотидную последовательность *ESRRa*; РНК-интерференция (нокдаун) путём трансдукции лентивирусными частицами, несущими короткую шпилечную РНК, специфичную для *ESRRa*. Инактивация *ERRa*: добавление в культуральную среду 10 мкМ синтетического ингибитора *ERRa* XCT-790. Для оценки влияния этих методов в клетках индуцировалась

остеогенная дифференцировка путём добавления в культуральную среду 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β -глицерофосфата. Эффективность остеогенной дифференцировки была оценена при помощи окраски ализариновым красным.

При снижении экспрессии ESRRA наблюдалось практически полное отсутствие остеогенной дифференцировки. Увеличение экспрессии ESRRA практически не влияло на остеогенную дифференцировку. Добавление ХСТ-790 к клеткам привело к существенному снижению уровня дифференцировки по сравнению с контролем. Добавление ХСТ-790 к клеткам, трансдуцированным лентивирусной конструкцией, повышающей экспрессию ESRRA, не привело к существенным изменениям уровня дифференцировки по сравнению с контролем. Добавление ХСТ-790 к клеткам с нокадауном по ESRRA вызвало снижение уровня дифференцировки и гибель клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ проекта 23-15-00320).

Оганесян Е.А.^{1,2} ✉, Лихоманова Р.Б.^{1,2}, Фофанов Г.К.², Шаматова М.М.¹, Шевцов М.А.^{1,2}, Юдинцева Н.М.^{1,2}

Оценка влияния тетродотоксина на клеточную подвижность в первичной культуре мультиформной глиобластомы человека

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

✉ praskovya_p@mail.ru

Аннотация. Клетки мультиформной глиобластомы человека (МГБ) обладают повышенным инвазивным потенциалом. Предполагается, что в клеточной подвижности могут участвовать потенциал-зависимые Na-каналы. В работе показано, что тетродотоксин снижает среднюю скорость и инвазивные свойства клеток первичных культур МГБ.

Ключевые слова: тетродотоксин; мультиформная глиобластома; потенциал-зависимые Na-каналы; первичные клеточные культуры; клеточная подвижность.

Oganesyanyan E.A.^{1,2}, Likhomanova R.B.^{1,2}, Fofanov G.K.², Shamatova M.M.¹, Shevtsov M.A.^{1,2}, Yudinseva N.M.^{1,2}

The effect of tetrodotoxin on the cell motility and migration characteristics of the primary culture of human glioblastoma multiforme

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Almazov NMRC, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Human glioblastoma multiforme (GBM) cells have an increased invasive potential. It is assumed that blocking of sodium channels affects the mobility of GBM cells. The study showed that tetrodotoxin reduces the average cell motility and migration characteristics of primary GBM cultures.

Keywords: tetrodotoxin; glioblastoma multiforme; voltage-gated Na-channels; primary cell cultures; cell motility.

Мультиформная глиобластома человека (МГБ) является агрессивной формой глиомы и распространенным типом опухоли глиальной ткани ЦНС. Высокий инвазивный потенциал опухолевых клеток играет ключевую роль в прогрессировании заболевания и поражении здоровых тканей пациента. В контроль клеточной подвижности вовлечено множество сигнальных путей, в частности в них участвуют потенциал-зависимые ионные каналы, которые являются основными кандидатами в качестве фармакологических мишеней для ингибирования миграции клеток глиобластомы. Известно, что различные фармакологические модуляторы потенциал-зависимых ионных каналов были успешно использованы для ингибирования клеточной миграции, инвазии и метастазирования при различных типах карцином *in vitro* и *in vivo*, однако на моделях подвижности клеток МГБ они остаются мало изученными.

Предварительно с помощью метода patch clamp нами были выявлены электро-возбудимые натриевые каналы Na_v на поверхности мембран клеток у первичных культур МГБ (IBD, TMS), которые блокировались 60 нМ тетродотоксином (ТТХ). Целью данной работы была оценка влияния ТТХ на клеточную подвижность клеток первичных культур МГБ: IBD, TMS.

В работе использовали клетки первичных культур МГБ, выделенные по стандартной методике из послеоперационного материала пациентов с подтвержденным диагнозом МГБ [1]. Оценку клеточной подвижности выполняли с использованием двух модельных систем: на поверхности лунок, покрытых Matrigel, и с помощью метода Transwell. В первом варианте эксперимент проводили с помощью автоматической

системы визуализации клеток Image ExFluorer (LCI, Корея). Съемку полей зрения ($n = 5$) производили каждые 15 мин в течение 24 ч. Для оценки инвазивных свойств клеток оценивали направленное движение клеток через проницаемую PET-мембрану (диаметр пор 3 мкм), обусловленное созданным градиентом концентраций хемоатtractанта [2, 3]. В качестве ингибитора в обоих вариантах эксперимента использовали ТТХ с концентрацией 60 нМ, в качестве контроля — клетки без воздействия ингибитора.

Полученные результаты были статистически обработаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде медианных значений с использованием 95% доверительных интервалов. Проверка на нормальность проводилась с использованием тестов Колмогорова-Смирнова. Все данные были распределены аномально. Для анализа различий по сравнению с контрольной группой использовали U-критерий Манна-Уитни. При анализе скорости движения полученные данные имели высокую статистическую значимость ($P_{\text{value}} < 0,0001$).

Было показано, что при движении на поверхности лунок добавление ингибитора ТТХ снижало скорость движения клеток в обеих первичных культурах (с 28,29 до 26 мкм/ч и с 23,6 до 22 мкм/ч для IBD и TMS, соответственно). Результаты TransWell также выявили ингибирование клеток и снижение скорости инвазии примерно на 17,93 и на 22,74%, соответственно для IBD и TMS. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективах использования ТТХ в качестве ингибитора инвазии опухолевых клеток МГБ.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Список литературы

1. Seidel S., Garvalov B.K., Acker T. Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens // *Methods Mol Biol.* 2015. Vol. 1235. P. 263–275. doi: 10.1007/978-1-4939-1785-3_19
2. Justus C.R., Marie M.A., Sanderlin E.J., et al. Transwell *in vitro* cell migration and invasion assays // *Methods Mol Biol.* 2023. Vol. 2644. P. 349–359. doi: 10.1007/978-1-0716-3052-5_22
3. Marshall J. Transwell invasion assays // *Methods Mol Biol.* 2011. Vol. 769. P. 97–110. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_8

Орлова П.А.¹ ✉, Карягина А.С.^{1–3}, Булыгина И.Н.^{1,2}, Зайцева С.В.^{1,2}, Пермякова Е.С.², Кудинова А.Г.¹, Кудан Е.В.², Даценко В.П.¹, Жулина А.В.¹, Грунина Т.М.¹, Гришин А.В.¹, Попонova М.С.¹, Кривоzubов М.С.¹, Струкова Н.В.¹, Сенатов Ф.С.^{1,2}, Лунин В.Г.¹, Громов А.В.^{1,2}

Бифункциональные имплантаты, включающие СВМПЭ, BMP-2 и лизостафин: *in vitro* и *in vivo* характеристика

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

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

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ p.orlova88@gmail.com

Аннотация. Разработан новый бифункциональный имплантат на основе пористого СВМПЭ с частицами кальций-магний-силикатной керамики диопсида в качестве носителя BMP-2 и желлан-ксантанового гидрогеля с рекомбинантным лизостафином, обладающий выраженными остеогенными свойствами и антистафилококковой активностью.

Ключевые слова: BMP-2; диопсид; желлан-ксантановый гидрогель; имплантат; лизостафин; остеогенез; *Staphylococcus aureus*; СВМПЭ.

Orlova P.A.¹, Karyagina A.S.^{1–3}, Bulygina I.N.^{1,2}, Zaitseva S.V.^{1,2}, Permyakova E.S.², Kudinova A.G.¹, Koudan E.V.², Datsenko V.P.¹, Zhulina A.V.¹, Grunina T.M.¹, Grishin A.V.¹, Poponova M.S.¹, Krivozubov M.S.¹, Strukova N.V.¹, Senatov F.S.^{1,2}, Lunin V.G.¹, Gromov A.V.^{1,2}

Dual-functional implants based on UHMWPE, BMP-2 and lysostaphin: *in vitro* and *in vivo* characterization

¹ Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russia

² Laboratory of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. A new bifunctional implant based on porous UHMWPE with particles of calcium-magnesium-silicate ceramics diopside as a carrier of BMP-2 and gellan-xanthan hydrogel with recombinant lysostaphin was developed. It has excellent osteogenic properties and antistaphylococcal activity.

Keywords: BMP-2; diopside; gellan-xanthan hydrogel; implant; lysostaphin; osteogenesis; *Staphylococcus aureus*; UHMWPE.

Лечение инфицированных костных дефектов — сложная проблема, т.к. инфекция значительно снижает регенеративный потенциал и замедляет заживление дефекта. Основным инфекционным агентом, вызывающим остеомиелит, является *Staphylococcus aureus*. Разработка бифункциональных имплантируемых материалов, остеогенность которых определяется наличием костного морфогенетического белка-2 (BMP-2), а антибактериальные свойства — присутствием антибактериального лизина, является одним из актуальных направлений в разработке новых остеопластических материалов. В нашей предыдущей работе описано создание такого рода имплантата на основе гидрогеля [1]. Для заполнения дефектов костной ткани в области, несущей нагрузку, необходимо создание гибридных имплантатов на основе жесткого скаффолда.

В качестве скаффолда для имплантата мы использовали пористый сверхвысокомолекулярный полиэтилен (СВМПЭ) с добавлением микрочастиц кальций-магний-силикатной биокерамики диопсида (Dio) или без него и с обработкой низкотемпературной плазмой или без нее. Проводили отработку введения BMP-2 и антибактериального лизина лизостафина (LST) в скаффолды с целью достижения постепенного выхода BMP-2 для индукции остеогенеза и взрывного выхода LST для немедленной элиминации стафилококковой инфекции в области имплантации.

Показано, что обработка низкотемпературной плазмой приводила к связыванию бóльших количеств рекомбинантных белков с СВМПЭ скаффолдом, но не со скаффолдом состава СВМПЭ + Dio. При этом скаффолд СВМПЭ + Dio полностью связывал 50 мкг BMP-2 и только 10–11 мкг из нанесённых 20 мкг LST, что могло быть недостаточно для полной элиминации стафилококка в экспериментах *in vivo*. Для повышения количества вводимого в имплантат LST было решено вводить лизостафин в составе геллан-ксантанового гидрогеля. При самопроизвольном введении гидрогеля в образцы СВМПЭ показано, что для нетравлёного СВМПЭ присутствие в его составе диопсида увеличивает всасывание гидрогеля примерно в 1,5 раза, в случае травлёного СВМПЭ и в присутствии диопсида и в его отсутствии образцы всасывали примерно в 2 раза больше гидрогеля. Максимальное количество гидрогеля (в 3 раза больше) вводилось в скаффолд при центрифугировании. Введение в скаффолд LST в составе гидрогеля с помощью центрифугирования позволило увеличить его количество до 80 мкг на образец. СЭМ лиофилизированных образцов с введённым гидрогелем демонстрирует присутствие плёнок гидрогеля в порах имплантата.

Оценку цитосовместимости образцов СВМПЭ с диопсидом и без, обработанных и необработанных низкотемпературной плазмой, проводили с помощью тестов на клетках линии миобластов C2C12. Клетки хорошо прикреплялись к поверхности всех образцов, через сутки наблюдалось полное распластывание клеток. В ходе культивирования клетки пролиферировали, через неделю они заняли всю поверхность образца. Это свидетельствует о высокой цитосовместимости всех образцов. Жизнеспособность клеток линии C2C12 после инкубации с экстрактами образцов, которую оценивали через 24 и 72 ч для всех образцов, — без и с травлением низкотемпературной плазмой, без и с рекомбинантными белками — составила 85–100%. Присутствие в составе СВМПЭ скаффолда частиц диопсида, травление низкотемпературной плазмой, а также введение в имплантаты LST и имитация введения LST не влияют на распластывание сфероидов из клеток C2C12. Напротив, введение BMP-2 положительно влияло на процессы распластывания сфероидов и миграции из них клеток, при том, что при имитации введения BMP-2 наблюдается замедление распластывания по сравнению с контролем.

Поскольку присутствие диопсида, в отличие от травления, давало явные преимущества для свойств скаффолда, в экспериментах *in vivo* использовали блоки пористого СВМПЭ с диопсидом размером 3×3×4 мм с 50 мкг BMP-2 и 80 мкг LST, введённым в составе геллан-ксантанового гидрогеля.

В эксперименте *in vivo* на мышинной модели сегментарного дефекта бедренной кости с интрамедуллярной фиксацией спицей показано, что через 9 недель в группе животных с СВМПЭ + Dio + BMP-2 + LST с инфекцией *S. aureus* по данным микроКТ и гистологического анализа наблюдалась полная интеграция имплантата с материнской костью с вращением костной ткани в поры имплантата на фоне отсутствия инфекции в области имплантации и окружающих мягких тканей. По данным теста на инвалидизацию на приборе Incapacitance Meter (Global Bio Inc, США) в этой группе происходило практически полное восстановление функции оперированной конечности. В группе без LST выявлялось инфицирование тканей, интеграции имплантата с костью и восстановления функции не наблюдалось. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале разрабатываемого имплантата для лечения инфицированных дефектов кости.

Исследование поддержано Российским научным фондом (проект № 22-15-00216).

Список литературы

1. Karyagina A.S., Grishin A.V., Kudinova A.G., et al. Dual-functional implant based on gellan-xanthan hydrogel with diopside, BMP-2 and lysostaphin for bone defect repair and control of staphylococcal infection // *Macromol Biosci.* 2024. ID e2400205. doi: 10.1002/mabi.202400205

Осидак Е.О.✉, Андреев А.Ю., Домогатский С.П.

Искусственная роговица Viscoll: путь от лаборатории до первых клинических результатов

ООО «Имтек», Москва, Россия

✉ eosidak@yandex.ru

Аннотация. В этой работе представлен опыт создания искусственной роговицы — коллагеновой мембраны Viscoll для послойной кератопластики. Описаны первые клинические результаты применения этой разработки.

Ключевые слова: искусственная роговица; коллагеновая мембрана; Viscoll; кератопластика.

Osidak E.O., Andreev A.Yu., Domogatsky S.P.

Viscoll artificial cornea: from the laboratory to the first clinical results

Imtek Ltd., Moscow, Russia

Abstract. This paper presents the experience of creating an artificial cornea — a Viscoll collagen membrane for layer-by-layer keratoplasty. The first clinical results of this development are also described.

Keywords: artificial cornea; collagen membrane; Viscoll; keratoplasty.

Нарушение прозрачности роговицы — одна из основных причин слепоты во всём мире. И хотя эту проблему можно эффективно решить с помощью кератопластики с использованием донорского материала, количество людей, ожидающих подобной помощи, уже достигло 13 миллионов, а прогнозируемый ежегодный прирост до 1 миллиона человек. Острая нехватка донорской роговицы для кератопластики в сочетании с культурными, религиозными и этическими барьерами приводит к тому, что ежегодно реальную медицинскую помощь получают не более 150–200 тысяч человек во всём мире. В связи с этим было предпринято множество попыток найти биоинженерное решение проблемы нехватки донорской ткани, но, несмотря на определённые успехи, ни одно из них не смогло решить эту проблему.

Учитывая мировой опыт в создании искусственной роговицы и поиске решения глобальной проблемы нехватки донорской ткани, наша команда разработала новый подход для решения этой проблемы. В основе нашего подхода лежит технология изготовления стерильного высококонцентрированного раствора коллагена — коллагена Viscoll. Это позволяет создавать прочные коллагеновые биоматериалы без использования технологии химических сшивок, которые ухудшают клеточную совместимость материала. Таким образом, была создана прочная, прозрачная, биосовместимая коллагеновая мембрана Viscoll для регенерации роговицы.

На первом этапе разработки этого медицинского изделия были проведены эксперименты на лабораторных животных, чтобы оценить эффективность и безопасность. В одной из наших первых опубликованных работ [1] было продемонстрировано, что имплантация коллагеновой мембраны Viscoll в карман роговицы кролика приводит к увеличению общей толщины роговицы и её прочностных характеристик, а также к сохранению прозрачности в течение шести месяцев после операции. При этом воспалительные процессы, вызванные хирургическим вмешательством и имплантацией материала, затухали за 1 неделю после операции. В следующей работе [2] животная модель была усложнена тем, что имплантацию материала внутрь роговицы кроликов проводили после хирургического удаления части стромы толщиной до 250–300 мкм. Через 6 месяцев была отмечена активная миграция клеток хозяина в имплантированный материал, при этом

прозрачность роговицы сохранялась у всех экспериментальных животных, что согласовывалось с предыдущими результатами. Удаление части стромы роговицы неизбежно приводит к потере иннервации роговицы. Поэтому существенным результатом данной работы стала доказанная эффективная интеграция мембраны с тканями роговицы, что в свою очередь поспособствовало регенерации нервов *in vivo*, что подтверждалось данными конфокальной микроскопии.

Проведённые исследования позволили продемонстрировать безопасность разработанной искусственной роговицы и её потенциальную эффективность для регенерации повреждённой роговицы у человека. Поэтому были инициированы клинические испытания коллагеновой мембраны Viscoll для оценки её эффективности для лечения повреждённой роговицы у человека.

В рамках клинических испытаний коллагеновая мембрана Viscoll была использована для послойной краевой кератопластики [3]. Фиксацию материала в трепанационном ложе осуществлялась посредством стандартного узлового хирургического шва. На четвёртый день после операции была отмечена полная эпителизация имплантированного материала. Наблюдение через девять месяцев показала хорошую интеграцию коллагеновой мембраны с окружающими тканями с сохранением прозрачности.

В совокупности полученных данных можно сделать вывод, что коллагеновая мембрана Viscoll имеет реальный потенциал для решения глобальной проблемы и может быть использована в качестве альтернативы человеческой донорской роговице для послойной кератопластики. Однако для более точной оценки необходимо продолжение клинических испытаний и более длительный срок наблюдения.

Список литературы

1. Andreev A.Y., Osidak E.O., Grigoriev et al. A new collagen scaffold for the improvement of corneal biomechanical properties in a rabbit model // *Exp Eye Res.* 2021. Vol. 207. ID 108580. doi: 10.1016/j.exer.2021.108580
2. Osidak E.O., Andreev A.Y., Avetisov S.E., et al. Corneal stroma regeneration with collagen-based hydrogel as an artificial stroma equivalent: a comprehensive *in vivo* study // *Polymers* 2022. Vol. 14, N 19. P. 4017. doi: 10.3390/polym14194017
3. Andreev A.Y., Yusef N.Y., Avetisov S.E., et al. Collagen-based artificial cornea for lamellar keratoplasty: an early case report // *Cornea.* 2024. Vol. 43, N 9. P. 1181–1183. doi: 10.1097/ICO.0000000000003583

Осинникова М.Н. ✉, Маясни Ю.П., Дмитриенко В.С., Осадчая Д.В., Ризванов А.А.

Исследование уровня экспрессии CD206, MMP9 и STAT3 в популяциях макрофагов, дифференцированных из мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ osinnikova.2003@gmail.com

Аннотация. В данном исследовании была выполнена дифференцировка мононуклеарных клеток периферической крови человека в популяции макрофагов M0, M1, M2 и показана дифференциальная экспрессия факторов CD206, MMP9 и STAT3, значительно повышенная у популяции M2, что демонстрирует её схожесть с TAM.

Ключевые слова: макрофаги; дифференцировка клеток; микроокружение; опухоль.

Osinnikova M.N., Mayasin Yu.P., Dmitrienko V.S., Osadchaya D.V., Rizvanov A.A.

Study of CD206, MMP9 and STAT3 expression levels in populations of macrophages differentiated from peripheral blood mononuclear cells *in vitro*

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. In this study, we differentiated human peripheral blood mononuclear cells into M0, M1, and M2 macrophage populations and showed differential expression of factors CD206, MMP9, and STAT3, which were significantly elevated in the M2 population, demonstrating its similarity to TAM.

Keywords: macrophages; cell differentiation; microenvironment; tumor.

На сегодняшний день ключевую роль развития опухоли отводят микроокружению, а не самому опухолевому ядру. Одним из наиболее важных компонентов ремоделинга опухолевого микроокружения являются ассоциированные с опухолью макрофаги (TAM, от англ. Tumor-associated macrophages), которые способствуют росту злокачественных новообразований *in vivo*. TAM — смешанная группа, в которой выделяют множество подтипов макрофагов, локализованных в опухоли или на её периферии, но доминантной однозначно является популяция M2-макрофагов, каноническим маркером которой признан маннозный рецептор CD206. TAM представляют один из основных функциональных компонентов опухолевой стромы и могут способствовать пролиферации и инвазии опухолевых клеток. Ранее было показано, что у макрофагов M2-типа увеличивается экспрессия матричной металлопротеиназы 9 (MMP9), которая может быть вовлечена в ремоделирование матрикса, ангиогенез и васкуляризацию [1]. Также, согласно данным литературы, повышенная экспрессия сигнального белка signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) в популяциях TAM ассоциирована с M2-поляризацией макрофагов и обеспечивает дифференцировку пролиферацию, ангиогенез и функциональную регуляцию клеток иммунной системы [2]. Направленная дифференцировка макрофагов и сравнение профилей экспрессии ключевых цитокинов с данными литературы необходимо для дальнейшего исследования межклеточных взаимодействий между опухолью и TAM в условиях *in vitro*. По этой причине целью работы было сравнение уровня экспрессии CD206, MMP9 и STAT3 между популяциями макрофагов (M0, M1, M2), дифференцированных из мононуклеарных клеток периферической крови *in vitro*. Мононуклеарные клетки периферической крови человека (МКПК) изолировали из цельной крови в градиенте плотности фиколла. Расчетная жизнеспособность клеточной культуры составила 96,7%.

Дифференцировка в субпопуляции макрофагов производилась из CD14⁺ моноцитов с добавлением GM-CSF (популяция M0), INF- γ , LPS (популяция M1), IL-4 и TGF- β (популяция M2), факторы добавляли в питательную среду RPMI-1640 на 3 и 6 день культивирования МКПК. Из-за внешней локализации маннозного рецептора CD206, первичную оценку его экспрессии в популяциях макрофагов проводили методом лазерной конфокальной микроскопии. Для этого часть дифференцированных клеток высевали на предметные стекла, фиксировали в растворе формалина и окрашивали конъюгированными антителами к CD206-APC (Biolegend). В образце M2-поляризованных макрофагов четко заметна экспрессия поверхностного маркера CD206, показатель средней интенсивности флюоресценции равен 7,5. При этом экспрессия маннозного рецептора в популяциях M1/M0 с помощью данной методики не обнаруживалась. Также экспрессия CD206 была дополнительно подтверждена методом western-blot анализа, в популяции M2-макрофагов она была выше на 86% по сравнению с популяцией M0 и на 53% выше, чем в популяции M1. Также методом western-blot анализа была подтверждена экспрессия факторов MMP9 и STAT3. Экспрессия MMP9 была выше в популяции M2 на 50 и 61% по сравнению с контрольными группами M0 и M1 соответственно. Экспрессия STAT3 была выше в популяции M2 на 75 и 79% соответственно. Полученные данные показывают, что показанный протокол дифференцировки МКПК подходит для создания трёх различных субпопуляций макрофагов — M0, M1 и M2. Также было показано, что полученные M2-макрофаги имеют значительно повышенный уровень экспрессии CD206, MMP9 и STAT3, что коррелирует с литературными данными об экспрессии среди TAM [3, 4]. При этом факторы MMP9 и STAT3 вовлечены и ремоделирование внеклеточного матрикса и индукцию транскрипции факторов роста соответственно, что является ключевыми параметрами для изучения механизмов опухолевого ангиогенеза и метастазирования в условиях *in vitro*.

Список литературы

1. Spiller K.L., Anfang R.R., Spiller K.J., et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, N 15. P. 4477–4488. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.02.012
2. Xia T., Zhang M., Lei W., et al. Advances in the role of STAT3 in macrophage polarization // *Front Immunol*. 2023. Vol. 14. ID 1160719. doi: 10.3389/fimmu.2023.1160719
3. Dong P., Ma L., Liu L., et al. CD86⁺/CD206⁺, diametrically polarized tumor-associated macrophages, predict hepatocellular carcinoma patient prognosis // *Int J Mol Sci*. 2016. Vol. 17, N 3. P. 320. doi: 10.3390/ijms17030320
4. Ge Z., Ding S. The crosstalk between tumor-associated macrophages (TAMs) and tumor cells and the corresponding targeted therapy // *Front. Oncol*. 2020. Vol. 10. ID 590941. doi: 10.3389/fonc.2020.590941

Осипов А.Н.^{1,2}✉, Чигасова А.К.^{1,2}, Осипов А.А.¹, Игнатов М.А.^{1,2}, Федотов Ю.А.^{1,2}, Воробьева Н.Ю.^{1,2}, Душенко М.В.¹, Абдуллаев С.А.^{1,2}

Молекулярные и клеточные эффекты компьютерной томографии в мезенхимальных стволовых клетках человека

¹ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

² Федеральный медицинский биофизический центр имени А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

✉ andreyan.osipov@gmail.com

Аннотация. Представлены результаты исследования влияния компьютерной томографии (КТ) на культивируемые мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) человека. Показано, что облучение рентгеновским излучением во время КТ не индуцирует выраженных негативных молекулярных и клеточных эффектов в облученных МСК.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; компьютерная томография; рентгеновское излучение; малые дозы; повреждения ДНК; транскриптом; РНК; экспрессия генов; клеточная гибель

Osipov A.N.^{1,2}, Chigasova A.K.^{1,2}, Osipov A.A.¹, Ignatov M.A.^{1,2}, Fedotov Yu.A.^{1,2}, Vorobyova N.Yu.^{1,2}, Dushenko M.V.¹, Abdullaev S.A.^{1,2}

Molecular and cellular effects of computed tomography scans in human mesenchymal stem cells

¹ N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Molecular and cellular effects in cultured human mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) exposed to CT scans were studied. It was shown that X-ray irradiation during CT scans does not induce pronounced negative molecular and cellular effects in irradiated MSCs.

Keywords: mesenchymal stem cells; computed tomography; X-ray radiation; low doses; DNA damage; transcriptome; RNA; gene expression; cell death.

В последнее время стремительно развивается регенеративная медицина, в которой часто применяется клеточная терапия с использованием стволовых клеток человека, в частности мультипотентных мезенхимальных стволовых/стромальных клеток (МСК). Несмотря на положительные стороны использования МСК, существуют ряд малоизученных аспектов, требующих проведения серьезных фундаментальных исследований. Одними из наиболее важных являются возможные негативные эффекты воздействия ионизирующего излучения в малых дозах при проведении, часто сопутствующих клеточной терапии, диагностических радиологических процедур, в частности, компьютерных томографий (КТ). Существует довольно много эпидемиологических работ, свидетельствующих об увеличении рисков возникновения злокачественных новообразований у детей и подростков после проведения КТ. С другой стороны, появились данные, напротив, свидетельствующие о положительных эффектах КТ, таких как уменьшение смертности от рака у людей и экспериментальных животных. Целью исследования был комплексный анализ молекулярных и клеточных эффектов компьютерной томографии в культивируемых МСК человека. В ходе выполнения исследования был проведен полногеномный транскриптомный анализ РНК МСК через 24 однократной или пятикратной КТ органов брюшной полости и таза человека (дозы 12 ± 2 и 60 ± 9 мГр, соответственно). Для облучения клеток использовали компьютерный томограф TOSHIBA AQUILION 64 (Япония). Анализ сигнальных путей показал, что через 24 ч после однократной КТ в МСК активируются сигнальные пути, регулирующие воспаление,

клеточный рост и взаимодействие клеток с внеклеточным матриксом. Через 24 ч после пятикратной КТ в МСК отмечается активация сигнальных путей, регулирующих внутриклеточный транспорт, в частности, ассоциированный с аппаратом Гольджи. Ингибированные клеточные пути включают сигнальные пути, отвечающие за клеточный метаболизм, а именно, трансляцию и нонсенс-опосредованный распад мРНК. Дополнительно был проведен анализ экспрессии генов NFκB (p50), TNFα, TAL1, P53, PTEN, P38 с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Результаты исследования показали, что воздействие рентгеновского излучения в дозах, соответствующих однократной или пятикратной КТ не приводило к статистически достоверному изменению экспрессии этих генов. Иммуноцитохимический анализ фокусов суррогатного белка-маркера двунитевых разрывов ДНК — фосфорилированного гистона H2AX (γH2AX) показал, что через 1 ч после облучения МСК при однократной КТ отмечается статически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества фокусов γH2AX ~ в 2,3 раза по сравнению с контролем. Повышенное количество фокусов γH2AX сохраняется до 4 ч после облучения. Через 1 ч после облучения МСК при пятикратной КТ отмечается статически значимое ($p < 0,05$) увеличение количества фокусов γH2AX ~ в 4.1 раза по сравнению с контролем. Повышенное количество фокусов γH2AX сохраняется до 6 ч после облучения. Результаты анализа фокусов фосфорилированной киназы АТМ (pATM) и их солокализации с фокусами γH2AX свидетельствуют о том, что КТ максимум активности АТМ наблюдался через 1 ч (55–65% солокализации), после чего через 2–6 ч отмечалось снижение солокализированных с γH2AX фокусов pATM до 30–40%. Это свидетельствует о том, что механизмы поддержания повышенного количества фокусов γH2AX через 2–6 ч после проведения КТ могут являться АТМ независимыми. В ходе исследования был проведен анализ внутриклеточной продукции активных форм кислорода и азота (АФК/А) в МСК через 0,5–48 ч после однократной или пятикратной КТ. Было показано, что после однократной КТ статически значимое ($p < 0,05$) увеличение продукции АФК/А ~ в 1,4 раза отмечалось только через 2 ч после воздействия. После пятикратной КТ статически значимое ($p < 0,05$) увеличение продукции АФК/А ~ в 2,3 раза отмечалось уже через 0,5 ч после воздействия. Повышенный уровень продукции АФК/А (~ в 1,3–1,6 раза по сравнению с контролем) сохранялся вплоть до 4 ч после облучения. Результаты анализа апоптоза и аутофагии показали, что как однократная, так и пятикратная КТ не приводит к статистически значимому изменению доли апоптотических или аутофагических МСК. Также не было отмечено статистически значимого изменения пролиферативной активности облученных клеток. В целом, полученные результаты свидетельствуют о том, что облучение рентгеновским излучением во время КТ не индуцирует выраженных негативных молекулярных и клеточных эффектов в облученных МСК. Однако для окончательного заключения о безопасности проведения КТ для МСК требуется тщательное комплексное исследование отдаленных эффектов КТ в поколениях облученных клеток.

Исследования выполнены при поддержке РФФИ (проект № 23-14-00078).

Павлова Г.В.^{1,2} ✉, Шамадыкова Дж.В.¹, Паршина В.В.¹, Пантелеев Д.Ю.¹, Ревещин А.В.¹

Разнообразие форм GDNF и их роль в дифференцировке прогениторных клеток ЦНС

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

✉ lkorochkin@mail.ru

Аннотация. Обнаружены новые формы GDNF, которые образуются в результате альтернативного сплайсинга. Показано, что некоторые малые формы xGDNF обладают высокой нейроиндукторной способностью и могут управлять нейрональной дифференцировкой прогениторных клеток ЦНС млекопитающих.

Ключевые слова: нейральная дифференцировка; прогениторные клетки; болезнь Паркинсона; нейротрофический фактор GDNF.

Pavlova G.V.^{1,2}, Shamadykova J.V.¹, Parshina V.V.¹, Panteleev D.Yu.¹, Revishchin A.V.¹

Diversity of GDNF forms and their role in the differentiation of CNS's progenitor cells

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Federal State Autonomous Institution N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. New forms of GDNF have been discovered that are formed as a result of alternative splicing. It has been shown that some small forms of xGDNF have a high neuroinducing ability and can control the neuronal differentiation of progenitor cells of the mammalian central nervous system.

Keywords: neural differentiation; progenitor cells; Parkinson's disease; neurotrophic factor 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 [1]. 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 как 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 полосатое тело мозга пациента с помощью

миниомпы на I фазе клинических испытаний показывало положительный эффект. Впоследствии, данный эффект не был подтвержден на II фазе двойных слепых клинических испытаний [2]. 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 РФФ № 24-15-00157

Список литературы

1. Lin L.F., Doherty D.H., Lile J.D., et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons // *Science*. 1993. Vol. 260, N 5111. P. 1130–1132. doi: 10.1126/science.8493557
2. Sidorova Y.A., Saarma M. Can growth factors cure parkinson's disease? // *Trends Pharmacol Sci*. 2020. Vol. 41, N 12. P. 909–922. doi: 10.1016/j.tips.2020.09.010

Павлова Г.В.¹⁻³ ✉, Колесникова В.А.¹, Пронин И.Н.², Усачев Д.Ю.², Копылов А.М.⁴

Дифференцировочная терапия стволовых/прогениторных клеток глиомы головного мозга человека

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² ФГАУ НМИЦ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко Минздрава России, Москва, Россия

³ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

⁴ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ lkorochkin@mail.ru

Аннотация. Разработан подход, способный улучшить терапию глиомы. Он основан на цитостатическом воздействии факторов: аптамер временно тормозит деление опухолевых клеток, молекулы-индукторы стимулируют дифференцировку клеток опухоли до зрелого нейронального состояния, прекращая пролиферацию по опухолевому типу.

Ключевые слова: глиома человека; опухолевые стволовые клетки; дифференцировочная терапия; нейрональная дифференцировка; аптамеры; молекулы-нейроиндукторы.

Pavlova G.V.¹⁻³, Kolesnikova V.A.¹, Pronin I.N.², Usachev D.Yu.², Kopylov A.M.⁴

Differentiation therapy of human brain glioma stem/progenitor cells

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Federal State Autonomous Institution N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Department of Medical Genetics, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

⁴ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. An approach has been developed that can improve the treatment of glioma. It is based on the cytostatic effect of factors: the aptamer temporarily inhibits the division of tumor cells, inducer molecules stimulate the differentiation of tumor cells to a mature neuronal state, stopping tumor-type proliferation.

Keywords: human glioma; tumor stem cells; differentiation therapy; neuronal differentiation; aptamers; neuroinducer molecules.

Глиома состоит из опухолевых стволовых клеток и их «дочерних опухолевых клеток» — незрелых клеток-предшественников. Цель работы — используя цитостатическое воздействие стимулировать «созревание» опухолевых клеток, что должно привести к потере их пролиферативного потенциала. В конечном итоге — создание коктейля факторов для дифференцировочной терапии глиомы человека.

Нами предложен принципиально новый подход к лечению глиомы — «дифференцировочная терапия», который основан на цитостатическом воздействии на клетки аптамера biG3T, способного блокировать пролиферацию опухолевых клеток, в комбинации с последующим добавлением молекул-индукторов, управляющих каскадами нейрогенеза — SB431542, LDN-193189, Purmorphamine, BDNF. Аптамер bi(AID-1-T) обладает цитостатическим действием и останавливая деление опухолевых клеток на некоторое время, позволяет опухолевой клетке стать чувствительной к другим воздействиям [1]. При временном снижении пролиферативной активности опухолевых клеток после воздействия аптамера, молекулы-индукторы способны направить дифференцировку опухолевых клеток в зрелое состояние. Дифференцировочная терапия оказывается эффективной и для опухолевых стволовых Nestin, PROM1(CD133)-позитивных клеток, устойчивых к химиотерапии и лучевой терапии. Исследования на клеточных культурах глиом пациентов высокой

степени злокачественности показали эффективность подобного подхода *in vitro*. Сформировав оптимальную и эффективную комбинацию аптамера и факторов, мы провели исследования *in vivo* с использованием животной модели (крыса) с имплантированной тканевой глиобластомой 101/8. Нами было обнаружено, что при использовании комбинации факторов дифференцировочной терапии *in vivo* необходима корректировка введения факторов [2]. Было показано, что после корректировки последовательности катетерного введения факторов дифференцировочной терапии достигается либо полное исчезновение опухоли, либо размер ее оказывался незначителен. Пилотные исследования на животной модели с глиобластомой *in vivo* показали перспективность данного метода.

Таким образом, разработана технология последовательного воздействия на опухолевые клетки глиомы высокой степени злокачественности для достижения дифференцировки опухолевых клеток и стабильного снижения их пролиферативного потенциала. Результат подтвержден на моделях *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (грант № 075–15–2024–561)

Список литературы

1. Pavlova G., Kolesnikova V., Samoylenkova N., et al. A combined effect of G-quadruplex and neuro-inducers as an alternative approach to human glioblastoma therapy // *Front Oncol.* 2022. Vol. 12. ID 880740. doi: 10.3389/fonc.2022.880740
2. Kolesnikova V., Revishchin A., Fab L., et al. GQIcombi application to subdue glioma via differentiation therapy // *Front Oncol.* 2024. Vol. 14. ID 1322795. doi: 10.3389/fonc.2024.1322795

Павлова С.А.^{1,2} ✉, Фаб Л.В.¹, Дзариева Ф.М.^{1,2}, Копылов А.М.^{2,3}, Павлова Г.В.^{1,2,4}

Комбинации аптамеров как новый подход к лечению глиобластом

¹ Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Минздрава РФ, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава РФ, Москва, Россия

✉ pavlova.sweti@yandex.ru

Аннотация. Глиобластомы являются одними из наиболее агрессивных опухолей нервной системы и отличаются гетерогенностью и крайней устойчивостью к терапии. Данная работа направлена на оценку целесообразности применения комбинаций нескольких аптамеров для достижения выраженного противоопухолевого эффекта.

Ключевые слова: опухоли нервной системы; глиобластомы; аптамеры; миграция клеток; пролиферация клеток; противоопухолевая терапия.

Pavlova S.A.^{1,2}, Fab L.V.¹, Dzarieva F.M.^{1,2}, Kopylov A.M.^{2,3}, Pavlova G.V.^{1,2,4}

The aptamer combinations as a new approach to the treatment of glioblastomas

¹ Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Federal State Autonomous Institution N.N. Burdenko National Medical Research Center of Neurosurgery of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ Belozersky Research Institute of Physical Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Department of Medical Genetics, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Glioblastomas are one of the most aggressive tumors of the nervous system and are characterized by heterogeneity and extreme resistance to therapy. This work aims to evaluate the suitability of applying combinations of several aptamers to achieve a significant antitumor effect.

Keywords: neural tumors; glioblastomas; aptamers; cell migration; cell proliferation; antitumor therapy.

Глиобластомы представляют собой наиболее агрессивную форму глиальных опухолей головного мозга человека. Они являются наиболее частыми из опухолей центральной нервной системы и составляют 60–70% всех глиом. Их отличает быстрый рост и высокая инвазивность, что делает их самыми смертоносными среди всех глиом. К сожалению, средняя продолжительность жизни пациентов после постановки диагноза составляет всего около года [1]. Существующие методы терапии не только не устраняют опухоль полностью, но и приводят к тому, что оставшиеся опухолевые клетки становятся более агрессивными и устойчивыми к дальнейшему лечению, что впоследствии приводит к возвращению заболевания. Кроме того, химиотерапия и лучевая терапия крайне негативно влияют на здоровые клетки, что значительно ухудшает состояние пациентов [2]. Это подчеркивает крайнюю актуальность поиска новых подходов к лечению глиобластомы.

Одним из наиболее перспективных направлений стало исследование влияния аптамеров на опухоль. Аптамеры – короткие одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, которые способны специфически связываться с белками-мишенями. От антител их выгодно отличает высокая специфичность, малые размеры, отсутствие иммуногенности и низкая токсичность.

Однако глиобластома отличается крайней гетерогенностью и зачастую использование одного аптамера не оказывает необходимого эффекта [3], а комбинирование с химиотерапией резко повышает токсичность. Решением может стать комбинированное воздействие нескольких аптамеров, каждый из которых воздействовал бы на свою мишень, что в итоге могло бы привести к запуску нескольких механизмов подавления опухолевого роста.

В данной работе мы исследовали влияние аптамеров bi-(AID-1-T) и bi-(AID-1-C) на клеточные культуры глиобластомы человека, полученные из послеоперационного материала при их однократном однократном и последовательном добавлении.

К клеточным культурам добавлялись различные варианты комбинаций аптамеров bi-(AID-1-T) и bi-(AID-1-C) в концентрации 10 мкМ и через 72 часа проводились наблюдения.

Было определено, что последовательность добавления аптамеров существенно влияет на оказываемый эффект. Некоторые из комбинаций оказывали стимулирующее действие как на пролиферативную, так и на миграционную активность клеточных культур.

Но при этом несколько комбинаций вызывали стойкое снижение и миграционной и пролиферативной активности. А выжившие клетки показали снижение злокачественности по сравнению с контролем.

Таким образом, последовательное воздействие нескольких аптамеров может приводить к выраженному и стойкому противоопухолевому эффекту, но подбор необходимых комбинаций требует тщательного изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта № 75-15-2024-561

Список литературы

1. Brown N.F., Ottaviani D., Tazare J., et al. Survival outcomes and prognostic factors in glioblastoma // *Cancers*. 2022. Vol. 14. P. 3161. doi: 10.3390/cancers14133161
2. Tsuji Y., Nonoguchi N., Okuzaki D., et al. Chronic pathophysiological changes in the normal brain parenchyma caused by radiotherapy accelerate glioma progression // *Sci Rep*. 2021. Vol. 11, N 1. P. 22110. doi: 10.1038/s41598-021-01475-0
3. Pavlova S., Fab L., Savchenko E., et al. The Bi-(AID-1-T) G-quadruplex has a janus effect on primary and recurrent gliomas: anti-proliferation and pro-migration // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2024. Vol. 17, N 1. P. 74. doi: 10.3390/ph17010074

Павлова С.В. ✉, Шульгина А.Е., Закиян С.М., Дементьева Е.В.

Влияние генетических вариантов с неясным клиническим значением в генах саркомерных белков на развитие гипертрофической кардиомиопатии на модели кардиомиоцитов, дифференцированных из изогенных линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных с помощью системы редактирования CRISPR/Cas9

Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ sonpavlova@gmail.com

Аннотация. Анализ свойств кардиомиоцитов, полученных из ИПСК с внесенными и исправленными вариантами с неясным клиническим значением p.N515del (c.1543_1545delAAC) гена *MYBPC3* и p.M659I (c.1977G>A) гена *MYH7*, а также изогенных контрольных ИПСК, свидетельствует в пользу патогенности данных вариантов.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП); генетический вариант с неясным клиническим значением; CRISPR/Cas9; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); кардиальная дифференцировка; кардиомиоциты.

Pavlova S.V., Shulgina A.E., Zakian S.M., Demytyeva E.V.

Studying the influence of variants of unknown significance in sarcomeric genes on the development of hypertrophic cardiomyopathy using cardiomyocytes derived from isogenic induced pluripotent stem cell lines generated with CRISPR/Cas9

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. Analyzing features of cardiomyocytes derived from iPSCs with introduced and corrected variants of unknown significance p.N515del (c.1543_1545delAAC) in *MYBPC3* and p.M659I (c.1977G>A) in *MYH7* and isogenic control iPSCs testifies in favor of pathogenicity of the variants.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy (HCM); genetic variant of unknown significance; CRISPR/Cas9; induced pluripotent stem cells (iPSC); cardiac differentiation; cardiomyocytes.

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) является одним из наиболее распространенных сердечно-сосудистых заболеваний и встречается с частотой 1:500. До 60% случаев заболевания являются наследственными. Большинство вариантов, вызывающих ГКМП, выявлено в генах саркомерных белков. Около 80% наследственных случаев ГКМП приходится на варианты генов *MYH7* и *MYBPC3*, кодирующих тяжелую цепь β -миозина и миозин связывающий белок С, соответственно. Внедрение в клиническую практику методов секвенирования нового поколения привело к выявлению в этих генах многочисленных вариантов с неясным клиническим значением. При генетическом анализе пациентов с ГКМП мы обнаружили два варианта с неясным клиническим значением: p.M659I (c.1977G>A) в гене *MYH7* и p.N515del (c.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* [1]. Замена p.M659I (c.1977G>A) расположена в функционально важном актин-связывающем

сайте моторного домена миозина, делеция p.N515del (с.1543_1545delAAC) находится в С3 домене сMyBP-C, характеризующемся высокой частотой патогенных вариантов. Значительный прогресс в изучении ГКМП достигнут с использованием технологии получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) от пациентов с ГКМП, несущих патогенные варианты, с последующей их дифференцировкой в кардиомиоциты. Подход упростил получение кардиомиоцитов с мутациями, связанными с ГКМП, и позволил пролить больше света на механизмы развития заболевания на молекулярном и клеточном уровнях. CRISPR/Cas9 — уникальный инструмент редактирования генома, имеющий множество применений в фундаментальной биологии и биомедицине. Метод позволяет создавать изогенные линии ИПСК, имеющие общий генетический фон и отличающиеся только наличием/отсутствием определенной мутации. Дифференцировка изогенных линий ИПСК в кардиомиоциты и сравнение свойств кардиомиоцитов позволяют оценить влияние мутации на развитие заболевания. Цель данной работы — использовать технологии ИПСК и CRISPR/Cas9 для выяснения влияния вариантов p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* и p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* на развитие гипертрофической кардиомиопатии. Ранее мы получили пациент-специфичные ИПСК, несущие мутации p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* [2] и p.N515del (с.1543_1545delAAC) в *MYBPC3* [3], а также с помощью системы CRISPR/Cas9 внесли данные мутации в геном линии ИПСК здорового донора ICGi022-A и охарактеризовали полученные изогенные линии ИПСК [4, 5]. В данной работе была создана вторая панель изогенных линий: с использованием системы CRISPR/Cas9 мутации p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* и p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* были исправлены в пациент-специфичных ИПСК. Редактирование проводили с помощью рибонуклеопротеиновых комплексов системы CRISPR/Cas9 и одноцепочечных донорных олигонуклеотидов, соответствующих нуклеотидной последовательности 18-го экзона гена *MYH7* и 17-го экзона гена *MYBPC3* здорового донора. После редактирования индивидуальные клоны ИПСК анализировали секвенированием по Сэнгеру. Было выявлено 6 клонов ИПСК с исправленной мутацией p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* и 8 клонов ИПСК с исправленной мутацией p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7*. Три линии ИПСК с исправленной мутацией p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* и две линии ИПСК с исправленной мутацией p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* были охарактеризованы стандартными методами. Полученные в результате редактирования линии ИПСК экспрессировали маркеры плюрипотентности, спонтанно дифференцировались в производные трех зародышевых листков и сохраняли нормальный кариотип. Анализ нуклеотидных последовательностей пяти наиболее вероятных предсказанных нецелевых сайтов системы CRISPR/Cas9 показал отсутствие нецелевой активности системы CRISPR/Cas9 в полученных линиях ИПСК. ИПСК с внесенными и исправленными вариантами в генах *MYH7* и *MYBPC3* и их изогенные контрольные линии были дифференцированы в кардиомиоциты по стандартному протоколу [5]. На 45 сутки после начала дифференцировки для всех типов кардиомиоцитов мы сравнили площади клеток, уровни ионов кальция на стадии покоя (с помощью флуоресцентного красителя Fluo-8 AM), экспрессии генов, отвечающих за развитие ГКМП, а также митохондриального дыхания и гликолиза (с помощью технологии Seahorse). Кардиомиоциты с мутациями p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* и p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3* (как пациент-специфичными, так и внесенными с помощью системы CRISPR/Cas9) имели достоверно большую площадь, в них наблюдались повышенные уровни ионов кальция на стадии покоя, экспрессии генов, связанных с развитием ГКМП, и некоторые отклонения в энергетическом метаболизме по сравнению с изогенными кардиомиоцитами с референсными генами *MYH7* и *MYBPC3*. Эти данные согласуются с предсказаниями *in silico* и свидетельствуют в пользу патогенности вариантов p.M659I (с.1977G>A) в гене *MYH7* и p.N515del (с.1543_1545delAAC) в гене *MYBPC3*.

Исследование поддержано РНФ (проект № 22-15-00271).

Список литературы

1. Дементьева Е.В., Вяткин Ю.В., Кретов Е.И., и др. Генетический анализ пациентов с гипертрофической кардиомиопатией // Гены и Клетки. 2020. Т. 15, № 3. С. 68–73. EDN: KWTOWP doi: 10.23868/202011011
2. Demytyeva E.V., Kovalenko V.R., Zhiven M.K., et al. Generation of two clonal iPSC lines, ICGi019-A and ICGi019-B, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.M659I mutation in MYH7 // Stem Cell Res. 2020. Vol. 46. ID 101840. doi: 10.1016/j.scr.2020.101840

3. Dementyeva E.V., Pavlova S.V., Chernyavsky A.M., et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line, ICGi029-A, by reprogramming peripheral blood mononuclear cells of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy and carrying a heterozygous p.N515del mutation in MYBPC3 // *Stem Cell Res.* 2021. Vol. 53. ID 102344. doi: 10.1016/j.scr.2021.102344
4. Павлова С.В., Шаяхметова Л.Ш., Проняева К.Я., и др. Получение линий индуцированных плюрипотентных стволовых клеток ICGi022-A-3, ICGi022-A-4 и ICGi022-A-5 с внесенной в ген *MYBPC3* с помощью системы CRISPR/Cas9 мутацией p.Asn515del // *Онтогенез.* 2023. Vol. 54. P. 105–113, EDN: FRUOIN doi: 10.31857/S0475145023010111
5. Pavlova S.V, Shulgina A.E., Zakian S.M., et al. Studying pathogenetic contribution of a variant of unknown significance, p.M659I (c.1977G>A) in MYH7, to the development of hypertrophic cardiomyopathy using CRISPR/Cas9-engineered isogenic induced pluripotent stem cells // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, N 16. P. 8695. doi: 10.3390/ijms25168695

Пак О.И., Косьянова А.А., Зайцев С.В., Брюховецкий И.С. ✉

Антагонист рецептора CXCR4-плериксафор повышает эффективность иммунотерапии и улучшает выживаемость крыс с глиомой C6

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

✉ igbryukhovetskiy@gmail.com

Аннотация. Антагонист рецептора CXCR4-плериксафор повышает эффективность иммунотерапии в эксперименте у крыс с глиомой C6, что сопровождается M1-активацией микроглии, достоверным снижением содержания в ткани мозга TGFβ, белков wnt3A, wnt5A, β-катенина и увеличением выживаемости экспериментальных животных.

Ключевые слова: глиобластома (ГБ); опухолевые клетки (ОК); рецептор CXCR4; микроглия; иммунотерапия (ИТ); микроокружение; плериксафор (ПЛФ).

Pak O.I., Kosianova A.A., Zaitsev S.V., Bryukhovetskiy I.S.

CXCR4-antagonist plerixafor enhances immunotherapy efficacy in C6 glioma-bearing rats: an *in vivo* experimental study

School of Medicine & Life Science, Medical Complex, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract. The CXCR4 receptor antagonist plerixafor increases the effectiveness of immunotherapy in an experiment in rats with C6 glioma, which is accompanied by M1 activation of microglia, a significant decrease in the content of TGFβ, wnt3A, wnt5A, β-catenin proteins in brain tissue and an increase in the survival of experimental animals.

Keywords: glioblastoma (GB); tumor cells (TC); CXCR4 receptor; microglia; immunotherapy (IT); microenvironment; plerixafor (PLF).

Глиобластома (ГБ) — одна из самых смертоносных опухолей головного мозга человека. Медиана выживаемости больных 345 дней [1]. Иммунотерапия (ИТ) может продлить жизнь больного, однако ее эффективность не велика в виду иммуносупрессивного воздействия незрелых клеток миелоидного ряда и стволовых клеток костного мозга [2], рекрутируемых опухолью через рецептор CXCR4. Цель работы, изучить в эксперименте *in vivo* влияние ингибитора CXCR4-рецептора — плериксафора (ПЛФ) на эффективность ИТ и выживаемость крыс с глиомой C6. Использованы аутбредные крысы породы Вистар. Применялись методы цитометрии, стереотаксической хирургии, лучевой и химиотерапии, иммуногистохимического и иммуноферментного анализа. Онковакцину (ОВ) готовили по путем 6 циклов замораживания и оттаивания ОК без криопротектора. Оценка выживаемости проведена по Каплану — Майеру. Крыс с глиомой C6 облучали с 14 дня эксперимента с помощью γ-терапевтической установки в дозе 6 Гр×5 фракций, до суммарной дозы (30 Гр). Темозоломид (ТМЗ) давали per os 40 мг/кг массы тела, 7 дней. Гранулоцитарный-колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) и интерферон (ИФН) γ вводили в/б по 4 мкг/день×4 дня. ПЛФ вводили п/к в дозе 0,24 мг/кг/день 7 суток. Сформировано 4 группы животных с глиомой C6: I — контрольная; II — группа (Г-КСФ+ИФНγ+ОВ), III — группа (ПЛФ+ИФНγ+ОВ), IV — группа (Г-КСФ+ПЛФ+ИФНγ+ОВ). Эксперимент одобрен Этическим Комитетом. Имплантация ОК в мозг крыс приводила к развитию инвазивной опухоли. Комбинация Г-КСФ с ПЛФ увеличивали число стволовых клеток костного мозга в крови крыс группы IV в 32,2 раза в сравнении с контролем. Введение онковакцины повышало содержание воспалительных цитокинов в крови, которое у животных

IV группы было максимальным и составило IL-1 β 11,8 \pm 4,4; IL18 17,5 \pm 8,7 пг/мл. В мозге крыс II группы содержание IBA1+ клеток микроглии было максимальным. ИТ у крыс группы III и IV сопровождалась M1-поляризацией микроглии, снижением содержания TGF β 1 до 44,2 \pm 6,1 и 30,2 \pm 4,5 нг/мл (против 37,3 \pm 16,4 нг/мл в контроле), снижением содержания белков wnt3A и wnt5A до 12,0 \pm 2,5 и 18,5 \pm 4,0 нг/мл (против 36,2 \pm 4,2 и 30,5 \pm 2,6 нг/мл в группе II и 22,8 \pm 6,3 и 33,6 \pm 6,3 нг/мл в группе III). Содержание β -катенина в мозге крыс с глиомой C6 в группе в группе IV 66,1 \pm 6,2 нг/мл (против 118,8 \pm 18,8 нг/мл в группе II и 72,5 \pm 10,8 нг/мл в группе III). Медиана выживаемости крыс группы IV составила 62 \pm 6,2 дня (против 35 \pm 9,9 дней в контроле). Таким образом, ПЛФ повышает эффективность ИТ в эксперименте у крыс с глиомой C6, что сопровождается M1-активацией микроглии и достоверным снижением содержания в ткани мозга TGF β , белков wnt3A, wnt5A, β -катенина и увеличением выживаемости экспериментальных животных.

Список литературы

1. Bruhn H., Tavelin B., Rosenlund L., et al. Do presenting symptoms predict treatment decisions and survival in glioblastoma? Real-world data from 1458 patients in the Swedish brain tumor registry // *Neurooncol Pract.* 2024. Vol. 11, N 5. P. 652–659. doi: 10.1093/nop/npae036
2. Hira V.V.V., Van Noorden C.J.F., Molenaar R.J. CXCR4 antagonists as stem cell mobilizers and therapy sensitizers for acute myeloid leukemia and glioblastoma? // *Biology (Basel).* 2020. Vol. 9, N 2. P. 31. doi: 10.3390/biology9020031

Паламарчук А.И. ✉, Стрельцова М.А.

Оверэкспрессия каталитической субъединицы теломеразы hTERT приводит к повышению уровня экспрессии PIK3CD NK-клеток

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

✉ palanastasia@yandex.ru

Аннотация. NK-клетки с оверэкспрессией hTERT характеризуются повышением экспрессии PIK3DC, активация которой напрямую связана с прогнозами лечения В-клеточных лимфом, ассоциированных с герпес-вирусами (CMV и EBV). Включение PIK3 сигнального пути может помочь получить более функциональные активные клетки.

Ключевые слова: иммунотерапия; NK-клетки; генетическая модификация; каталитическая субъединица теломеразы (hTERT); выживаемость клеток; функциональная активность; PIK3DC.

Palamarchuk A.I., Streltsova M.A.

Overexpression of the hTERT telomerase catalytic subunit leads to an increase in the expression level of PIK3CD in NK cells

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

Abstract. NK cells with hTERT overexpression are characterized by increased expression of PIK3DC which activity is directly related to the prognosis of B-cell lymphomas associated with herpesviruses (CMV and EBV). Stimulation of the PIK3 signaling pathway enables obtaining more functionally active cells.

Keywords: immunotherapy; NK cells; genetic modification; catalytic telomerase subunit (hTERT); cell survival; functional activity; PIK3DC.

NK-клетки или натуральные киллеры относятся к клеткам врождённого иммунитета, которые обеспечивают иммунный надзор за вирусными инфекциями и трансформированными злокачественными клетками. Благодаря быстрому развитию иммунного ответа NK-клетки считаются многообещающим инструментом для развития различных терапевтических подходов. Снижение активности каталитической субъединицы дельта фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат 3-киназы (PIK3CD) вызывает функциональное истощение, старение и нарушение цитотоксической активности NK-клеток [1, 2], что приводит к ослаблению иммунного надзора NK-клетками над герпесвирусами (CMV, EBV) и трансформированными клетками [1]. Поскольку известно, что hTERT удлинняет теломерные концы хромосом, оверэкспрессия hTERT может способствовать повышению репликативного потенциала hTERT-модифицированных клеток. Кроме этого hTERT обладает рядом неканонических свойств, таких как сохранение фенотипа функционально активных клеток наряду с повышенной выживаемостью [3]. Поэтому целью данной работы стало выявление возможных терапевтических преимуществ у NK-клеток с оверэкспрессией hTERT. В этой работе мы провели ретровирусную трансдукцию NK-клеток геном, кодирующим каталитическую субъединицу теломеразы, hTERT. В качестве контроля были взяты NK-клетки, трансдуцированные геном iCasp9, который позволяет элиминировать модифицированные клетки в случае развития неблагоприятных осложнений.

Были получены данные об уровнях экспрессии мРНК в трансдуцированных клетках методом RNA-Seq. Для hTERT-NK-клеток отмечали увеличение уровня экспрессии транскриптов гена PIK3CD. Активация PIK3CD в NK-клетках ассоциирована с повышением CD16, HLA-I, NKp44, гранзимом В, перфорином и KLRG1 [2]. Хотя по данным RNA-Seq мы наблюдали повышение только уровня гранзима В, накопление PIK3CD в NK-клетках может способствовать повышению экспрессии CD16, HLA-I, NKp44, гранзима В, перфорина в случае активации PIK3CD. Подобное повышение экспрессии PIK3CD, вероятно, можно считать благоприятным, так как hTERT-NK-клетки способны усилить свою функциональную активность после активации PIK3CD. Сигналинг пути PIK3 напрямую связан с прогнозами лечения различных В-клеточных лимфом, в том числе ассоциированных с герпесвирусами (CMV и EBV). Тем не менее, постоянная активность PIK3DC неблагоприятна и связана с функциональным истощением клеток и их анергией. Нами получены клетки с повышенной экспрессией PIK3DC. Дополнительная активация PIK3DC внешними стимулами может позволить клеткам приобрести активированный фенотип без утраты функциональной активности, вследствие продолжительного сигналинга через PIK3DC. Таким образом, hTERT-NK-клетки характеризуются улучшенными пролиферативными и функциональными характеристиками, которые могут быть расширены путём дополнительной транзиторной активации через PIK3CD ассоциированные рецепторы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-75-10136).

Список литературы

1. Carpier J., Lucas C.L., Lucas C.L. Epstein–Barr virus susceptibility in activated PI3K δ syndrome (APDS) immunodeficiency // *Front Immunol.* 2018. Vol. 8. ID 2005. doi: 10.3389/fimmu.2017.02005
2. Edwards E.S.J., Bier J., Cole T.S. Activating PIK3CD mutations impair human cytotoxic lymphocyte differentiation and function and EBV immunity // *J Allergy Clin Immunol.* 2018. Vol. 143, N 1. P. 276–291. doi: 10.1016/j.jaci.2018.04.030
3. Romaniuk A., Paszel-Jaworska A., Totań E., et al. The non-canonical functions of telomerase: to turn off or not to turn off // *Mol Biol Rep.* 2019. Vol. 46, N 1. P. 1401–1411. doi: 10.1007/s11033-018-4496-x

Паншин Д.Д. ✉, Тарасов М.С., Смирнова Д.В., Енукашвили Н.И., Малашичева А.Б.

Варибельная экспрессия RUNX2 и Notch оказывает влияние на уровни профибротических маркеров в активированных фибробластах легкого

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ dany.panshin@yandex.ru

Аннотация. В ходе исследования было показано влияние гиперэкспрессии/подавления сигнального пути Notch и транскрипционного фактора RUNX2 в фибробластах легкого, ассоциированных с опухолью (FAT), на уровни профибротических маркеров, а также на уровни самих RUNX2 и Notch.

Ключевые слова: фиброз; сигнальный путь Notch; транскрипционный фактор RUNX2; лентивирусная трансдукция.

Panshin D.D., Tarasov M.S., Smirnova D.V., Enukashvili N.I., Malashicheva A.B.

The variable expression of RUNX2 and Notch affects the levels of profibrotic markers in activated lung fibroblasts

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study showed the effect of overexpression/suppression of the Notch signaling pathway and RUNX2 transcription factor in tumor-associated lung fibroblasts (FAT) on the levels of profibrotic markers, as well as on the levels of RUNX2 and Notch themselves.

Keywords: fibrosis; Notch signaling pathway; RUNX2 transcription factor; lentiviral transduction.

Сигнальный путь Notch — известный регулятор клеточных судьб, он оказывает критическое влияние на развитие организма как на эмбриональном, так и на постэмбриональном этапах. Описано влияние Notch на процессы формирования сердечно-сосудистой, нервной и опорно-двигательной систем [2]. Кроме того, известно его участие в фибротических процессах различных тканей [4]. В свою очередь, транскрипционный фактор RUNX2 известен как мастер-ген остеогенеза, но помимо этого, он так же как и Notch, активно участвует в поддержании тканевого гомеостаза [1]. Показано его прямое участие на патологическое развитие фибробластов [3]. Наличие у Notch и RUNX2 перекрывающихся фундаментальных процессов регуляции, а также опосредованное развития схожих заболеваний, делает изучение их взаиморегуляции и совместного влияния на клеточные процессы в организме важной задачей. Целью данной работы было изучить влияние RUNX2 и Notch на патогенез фиброза.

В качестве клеточной модели использовали фибробласты легкого, ассоциированные с опухолью (FAT), полученные как описано ранее.

Индукцию фиброза осуществляли при помощи добавления в среду культивирования клеток блеомицина или цитокина TGF- β . Активацию сигнальных путей Notch и RUNX2 производили при помощи трансдукции лентивирусными конструкциями, содержащими последовательность внутриклеточного домена гена *NOTCH1* (NICD) или последовательность гена *RUNX2*. Для подавления экспрессии генов сигнальных каскадов использовались конструкции, кодирующие малые шпилечные РНК, комплементарные участкам генов *RUNX2* и *CSL*. Экспрессию генов-мишеней анализировали методом количественной ПЦР.

Комбинация гиперэкспрессии и подавления *RUNX2* и *Notch* оказывали дифференциальное влияние на экспрессию профибротических маркеров. Гиперэкспрессия NICD в клетках, активированных TGF- β повышала уровень *HEY1*. Уровень *RUNX2* повышался в ответ на гиперэкспрессию *RUNX2* и подавление *Notch*, и достоверно снижается при двойной трансдукции *RUNX2* + NICD, что подтверждает влияние *Notch* на экспрессию *RUNX2*. При изучении активности профибротических маркеров *ACTA2*, *COL1A1*, *SLUG* и *SNAI1* было отмечено, что блеомицин подавляет большинство исследуемых генов (*ACTA2*, *COL1A1*, *SLUG*). В присутствии TGF- β гиперэкспрессия NICD приводит к активации *ACTA2* и *SLUG*, подавление *RUNX2* усиливает этот эффект. В то время как активация *RUNX2* и подавление *Notch* приводили к росту уровня *COL1A1* и *SNAI1*.

Помимо этого, был проведен ряд экспериментов с использованием статических концентраций вируса *RUNX2* и логарифмически возрастающих концентраций NICD, что показало нелинейное влияние уровня NICD на уровни *RUNX2* и *HEY1*. Уровень *COL1A1* снижался при низкой концентрации NICD и возрастал с увеличением концентрации. В клетках активированных блеомицином уровень *SNAI1* снижался использованием минимального количества NICD и возрастал до контрольных значений при максимальной концентрации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что *RUNX2* и *Notch* оказывают нелинейное и дозозависимое влияние на экспрессию друг друга и маркеров фиброза.

Список литературы

1. Chuang L. S. H., Ito K., Ito Y. RUNX family: regulation and diversification of roles through interacting proteins // *Int J Cancer*. 2013. Vol. 132, N 6. P. 1260–1271. doi: 10.1002/ijc.27964
2. MacGrogan D., Münch J., la Pompa J. L. de. Notch and interacting signalling pathways in cardiac development, disease, and regeneration // *Nat Rev Cardiol*. 2018. Vol. 15, N 11. P. 685–704. doi: 10.1038/s41569-018-0100-2
3. Mümmeler C., Burgy O., Hermann S., et al. Cell-specific expression of runt-related transcription factor 2 contributes to pulmonary fibrosis // *FASEB Journal*. 2018. Vol. 32, N 2. P. 703–716. doi: 10.1096/fj.201700482R
4. Vaughan A.E., Brumwell A.N., Xi Y., et al. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after major injury // *Nature*. 2015. Vol. 517, N 7536. P. 621–625. doi: 10.1038/nature14112
5. Erukashvily N.I., Ponomartsev N.V., Ketkar A., et al. Pericentromeric satellite lncRNAs are induced in cancer-associated fibroblasts and regulate their functions in lung tumorigenesis // *Cell Death Dis*. 2023. Vol. 14, N 1. P. 19. doi: 10.1038/s41419-023-05553-1

Пань Сяовень^{1,2}, Вишнякова Х.С.¹, Ясько М.В.¹, Егоров Е.Е.^{1,2} ✉

Свободные жирные кислоты с длинной цепью стимулируют вторую волну роста волос у мышей C57Bl/6

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

✉ yegorov58@gmail.com

Аннотация. Изучали влияние аппликации свободных жирных кислот с длинной цепью на начало анагена у мышей C57Bl/6. Показано, что пальмитиновая и олеиновая кислоты ускоряют начало второго анагена, а раствор лактата тормозит. Эти данные коррелируют с прежними результатами, полученными на старых мышах.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты; рост волос; анаген; пальмитат; олеат; лактат.

Pan Xiaoven^{1,2}, Vishnyakova Kh.S.¹, Jasko M.V.¹, Yegorov Ye.E.^{1,2}

Free long chain fatty acids stimulate the second wave of hair growth in C57Bl/6 mice

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

Abstract. We studied the effect of application of free long chain fatty acids on the onset of anagen in C57Bl/6 mice. It was shown that palmitic and oleic acids accelerate the onset of the second anagen, while lactate solution inhibits it. These data correlate with previous results obtained with old mice.

Keywords: free fatty acids; hair growth; anagen; palmitate; oleate; lactate.

Процесс роста волос является одним из немногих примеров истинной регенерации у человека, поэтому имеет прямое отношение к процессам воспаления [1]. В отличие от человека, рост волос у мышей происходит волнами, когда волосы синхронно перестают расти, а потом синхронно вступают в анаген. Излюбленная модель изучения роста волос у мышей является изучение времени начала второй волны роста (примерно 60–80 дней от рождения [2]). У мышей C57Bl/6 в возрасте 45 дней (время телогена) с помощью специального крема (для чувствительной кожи Minima (Veet)) депилировали волосы на спине. В этой ситуации волосы довольно долго не растут, а начало роста проявляется почернением кожи. Телогеновая кожа у этих черных мышей имеет розовый цвет. Изучали влияние аппликации различных свободных жирных кислот с длинной цепью (СЖК) на начало анагена (время появления серой окраски кожи). Приготовляли 10% растворы СЖК на нерафинированном оливковом масле. Растворы СЖК наносили на спину по 100 мкл каждый второй день после депиляции. Контрольных мышей мазали просто оливковым маслом. Использовали растворы пальмитиновой, олеиновой, линолевой кислот, а также их смеси, по содержанию, похожей на оливковое масло (75% олеиновой, 15% пальмитиновой, 8% линолевой и 2% линоленовой кислот). Также использовали раствор 14% лактата на глицерине. рН лактата предварительно доводили до 5,5 с помощью раствора КОН. Результаты показали, что пальмитиновая и олеиновые кислоты ускоряют начало второго анагена ($p = 0,018$ и $p = 0,007$), а раствор лактата тормозит ($p = 0,004$). Линолевая кислота и смесь кислот ускоряли наступление анагена, но недостоверно ($p = 0,54$ и $p = 0,14$). Эти данные коррелируют с нашими прежними результатами, полученными на модели алопеции у стареющих мышей. Натуральное средство на основе свободных жирных кислот стимулировало зарастание плешей [3]. Угнетение лактатом начала анагена можно объяснить торможением гликолиза, который совершенно необходим для роста волос [4].

С другой стороны, нами показано, что СЖК вызывают метаболический сдвиг в сторону гликолиза (условие для роста волос) в клетках в культуре [5]. Альтернативно, результаты можно трактовать так, что вещества, индуцирующие провоспалительные изменения способствуют ускорению прохождения волосяного цикла, а лактат, обладающий иммуносупрессивным действием тормозит начало второго цикла роста.

Список литературы

1. Morgun E.I., Vorotelyak E.A. Epidermal stem cells in hair follicle cycling and skin regeneration: a view from the perspective of inflammation // *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8. ID 581697. doi: 10.3389/fcell.2020.581697
2. Plikus M.V., Chuong C.M. Complex hair cycle domain patterns and regenerative hair waves in living rodents // *J Investigat Dermatol.* 2008. Vol. 128, N 5. P. 1071–1080. doi: 10.1038/sj.jid.5701180
3. Vishnyakova K.S., Vetkova L.G., Jasko M.V., et al. Hair growth stimulation by a natural remedy: animal studies // *Madridge J Dermatol Res.* 2018. Vol. 3, N 1. P. 37–44. doi: 10.18689/mjdr-1000109
4. Flores A., Schell J., Krall A.S., et al. Lactate dehydrogenase activity drives hair follicle stem cell activation // *Nature Cell Biology.* 2017. Vol. 19, N 9. P. 1017–1026. doi: 10.1038/ncb3575
5. Вишнякова Х.С., Попов К.В., Пан Х., и др. Влияние свободных жирных кислот на накопление липидов, активацию лизосом и сдвиг метаболизма различных культивируемых клеток в сторону гликолиза // *Молекулярная биология.* 2021. Т. 55, № 4. С. 683–696. EDN: SECGTW doi: 10.31857/S0026898421040145

Пань Сяовень^{1,2}, Чегодаев Е.С.^{1,3}, Вишнякова Х.С.¹, Журавлев А.Д.³, Никифоров Н.Г.^{1,3}, Егоров Е.Е.^{1,2} ✉

Влияние свободных жирных кислот на продукцию цитокинов клетками человека

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

³ Институт общей патологии и патофизиологии «НИИОПП», Москва, Россия

✉ yegorov58@gmail.com

Аннотация. Показано, что под действием пальмитиновой кислоты моноциты человека увеличивают секрецию TNF- α , CCL2, IL-6 и IL-8, но не IL-1 β . Олеиновая, линолевая и линоленовые кислоты не меняют секрецию цитокинов, кроме IL-8. Фибробласты и кератиноциты человека не отвечают на упомянутые жирные кислоты.

Ключевые слова: моноциты; жирные кислоты; фибробласты; кератиноциты; интерлейкины; цитокины.

Pan Xiaoven^{1,2}, Chegodaev Ye.S.^{1,3}, Vishnyakova Kh.S.¹, Zhuravlev A.D.³, Nikiforov N.G.^{1,3}, Yegorov Ye.E.^{1,2}

Influence of free fatty acids on cytokine production by human cells

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

³ Institute of General Pathology and Pathophysiology "NIIOPP", Moscow, Russia

Abstract. It has been shown that under the influence of palmitic acid, human monocytes increase the secretion of TNF- α , CCL2, IL-6 and IL-8, but not IL-1 β . Oleic, linoleic and linolenic acids do not change the secretion of cytokines, except IL-8. Human fibroblasts and keratinocytes do not respond to the fatty acids mentioned.

Keywords: monocytes; fatty acids; fibroblasts; keratinocytes; interleukins; cytokines.

Свободные жирные кислоты (СЖК), в связи с многообразием их функций, привлекают повышенное внимание исследователей. Помимо всем известных функций накопления жира и построения мембран, СЖК могут вызывать разобщение митохондрий, участвуют в регуляции метаболизма и дифференцировки, в образовании простаноидов и различных медиаторов воспаления [1]. Моноциты-макрофаги вдобавок к обычным фагоцитарным функциям участвуют в регуляции воспаления, и воздействие на них является одним из способов регуляции воспаления. Изучали действие различных СЖК (пальмитиновой, олеиновой, линолевой, линоленовой, арахидоновой) на продукцию цитокинов клетками человека в культуре. Поскольку СЖК обладают очень низкой растворимостью в воде, предварительно приготавливали конъюгаты СЖК с альбумином в соотношении примерно 10 молекул СЖК на одну молекулу альбумина. СЖК добавляли к клеткам на 24 часа в концентрациях от 20 до 100 мкМ. В качестве клеток использовали иммортализованные кератиноциты человека HaCat и линию диплоидных фибробластов человека 977hTERT. Линия была получена нами ранее с помощью лентивирусной трансдукции штамма эмбриональных фибробластов человека 977. Моноциты выделяли из цельной крови при помощи магнитной сепарации с использованием CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec) при помощи колонок (Miltenyi Biotec). Иммуноферментный анализ проводили в 96-луночном планшете (SPL) с использованием реагентов DuoSet ELISA Development System. Антитела были (R&D Systems), оптическую плотность калибраторов и исследуемых образцов измеряли на планшетном ридере (ClarioStar Plus, BMG Labtech). Показано, что фибробласты и кератиноциты человека не отвечают на упомянутые жирные кислоты повышением секреции TNF- α , CCL2, IL-6, IL-8 и IL-1 β и имеют крайне низкий уровень их базальной секреции в сравнении с моноцитами. Под действием пальмитиновой кислоты,

моноциты человека увеличивают секрецию TNF- α , CCL2, IL-6 и IL-8, но не IL-1 β . Олеиновая, линолевая и линоленовые кислоты не изменяют секрецию цитокинов, кроме IL-8. Арахидоновая кислота достоверно увеличивает секрецию IL-8 и CCL2 моноцитами. Таким образом, показано, что пальмитиновая кислота вызывает провоспалительную активацию моноцитов человека, но не других клеток. Это подчеркивает возможную роль TLR4 в этом процессе [2].

Список литературы

1. Вишнякова Х.С., Попов К.В., Рап Х., и др. Влияние свободных жирных кислот на накопление липидов, активацию лизосом и сдвиг метаболизма различных культивируемых клеток в сторону гликолиза // Молекулярная биология. 2021. Т. 55, № 4. С. 683–696. EDN: SECGTW doi: 10.31857/S0026898421040145
2. Lancaster G.I., Langley K.G., Berglund N.A., et al. Evidence that TLR4 is not a receptor for saturated fatty acids but mediates lipid-induced inflammation by reprogramming macrophage metabolism // Cell Metabolism. 2018. Vol. 27, N 5. P. 1096–1110. doi: 10.1016/j.cmet.2018.03.014

Парамонов Б.А.¹, Хоанг Х.Т.¹✉, Парамонова Н.М.², Юдинцева Н.М.³

Микроаутодермопластика при лечении ожогов

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ huytoanhoang@gmail.com

Аннотация. При лечении ожогов микроаутодермопластикой (МАП) на рану редко наносят кусочки кожи (1×1 мм), на которые накладывают раневые покрытия. Изучали эффективность МАП при использовании 8 типов раневых покрытий. Лучшие результаты получены при применении раневых покрытий на основе трековых мембран.

Ключевые слова: раневые покрытия; ожоги; кожная пластика.

Paramonov B.A.¹, Hoang H.T.¹, Paramonova N.M.², Yudintseva N.M.³

Micro-autograft in burn treatment (new technology options)

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

² I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. In burn treatment using microautografts (MAG), skin pieces (1×1 mm) are rarely applied to the wound and covered with dressings (WD). The effectiveness of MAG was evaluated with 8 types of WD, with the best results from track-etched membrane-based dressings.

Keywords: wound dressings; burns; skin graft.

Метод микроаутодермопластики (МАП) предназначен для восстановления кожного покрова при обширных глубоких ожогах при выраженном дефиците «донорских ресурсов». Суть метода заключается в редком нанесении на поверхность раны микротрансплантатов (МТ) аутологичной кожи размером около 1×1 мм, которые покрываются аллогенной (преимущественно — трупной) кожей. Измельчение кожных лоскутов приводит к увеличению суммарной длины линии краевой эпителизации и, при этом, пролиферирует существенно большее количество клеток. Временное приживление аллогенной кожи не только защищает рану от инфицирования и высыхания, но и обеспечивает приживление МТ и затем способствует процессам краевой эпителизации. Восстановление аутологичной кожи (из МТ) происходит под «защитой» аллогенной. К моменту отторжения аллокожи эпителизация, как правило, уже завершена. Выполнение операции позволяет достичь коэффициента пластики 1:40. Однако использование трупной кожи в соответствии с ФЗ № 323-2011г. запрещено. Поиск заместителей аллокожи для выполнения МАП является актуальной задачей. Целью исследования является отработка в эксперименте режимов выполнения операции МАП с использованием раневых покрытий. Подбор оптимального раневого покрытия осуществляли на крысах (выполнено 5 серий экспериментов на 90 животных), у которых моделировали полнослойные раны на спине (округлой и прямоугольной формы). Поверх МТ накладывали различные виды материалов: аллогенную кожу, срезанную у других крыс; раневые покрытия без и с выращенной на поверхности пленки культурой фибробластов; лиофилизированную дерму. Результаты: Лучшие результаты были достигнуты при использовании поверх МТ раневых покрытий на основе трековых мембран. При это достигнут коэффициент пластики 1:15. Трековая мембрана по сути является микробным фильтром и, кроме того, обеспечивает оптимальный водный баланс

в ране. Гидроколлоидный слой благоприятно влияет на процессы краевой эпителизации из МТ. Культура фибробластов в данной экспериментальной модели не оказывала существенного влияния на пролиферацию клеток краевой зоны МТ. Ксеногенная кожа избыточно высушивала рану и МТ.

Парамонов Б.А.¹, Парамонова Н.М.^{2,3} ✉

К вопросу о возможной персистенции вируса COVID-19 в волосяных фолликулах

¹ ФБГБУВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия² Комплекс «ЦДТИ» ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия³ ФГБУ Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

✉ natapa@bk.ru

Аннотация. Выявление коронавируса в клетках волосяного фолликула у переболевшего COVID-19 пациента позволяет сделать предположение о возможности длительной персистенции вируса и непосредственном влиянии инфекции на рост и состояние волос.

Ключевые слова: COVID-19; кожа головы; волосяной фолликул; коронавирус.

Paramonov B.A.¹, Paramonova N.M.^{2,3}

To the question of possible persistence of the COVID-19 virus in hair follicles

¹ S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia² Department for Clinical Trials and Evidence-Based Medicine, Almazov Research Centre, Saint Petersburg, Russia³ State Institute for Experimental Military Medicine of the Ministry of Defense, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The detection of coronavirus in hair follicle cells in a patient who has been ill with COVID-19 allows us to make an assumption about the possibility of long-term persistence of the virus and the direct effect of infection on hair growth and condition.

Keywords: COVID-19; scalp; hair follicle; coronavirus particles.

Нарушения роста волос после перенесенной коронавирусной инфекции отмечены большинством специалистов [1, 2]. После спада пандемии COVID-19 прошло совсем немного времени и, по этой причине, научных исследований, посвященных влиянию данной инфекции на состояние волос, немного. Данные из интернета свидетельствуют о большом количестве людей (до 95%), которые после перенесенной инфекции имели различные проблемы с кожей головы — зуд, шелушение. Переболевшие отмечают ухудшение качества волос. Несмотря на то, что оценка большинства из параметров качества имеет субъективный характер, пренебрегать этим не стоит. У пациентов может меняться цветность волос, утрачивается их блеск. Имеют место случаи, когда меняется характер роста волос, они становятся волнистыми. Происходит снижение механических свойств волос — истончение и повышенная ломкость. Имеются данные о том, что после перенесенной инфекции меняются результаты т.н. теста натяжения (pull-test). Усиленное выпадение волос отмечено практически у ¼ пациентов, наблюдавшихся у трихологов. Предполагаем, что число таких пациентов намного выше. Объяснений выдвигается достаточно много: интоксикация; образование микротромбов, вызывающих нарушение микроциркуляции волосяных фолликулов; токсическое воздействие применяемых лекарственных препаратов (антибиотиков, противовирусных, иммунодепрессантов, иммуномодуляторов и др.); поражение эндотелиоцитов. Известно, что для проникновения вируса SARS-CoV-2, вызвавшего пандемию COVID-19, в клетки хозяина ему необходимо задействовать рецептор ACE-2 (ангиотензинпревращающего фермента 2), который экспрессируется в различных органах и слизистых человека, в том числе и базальных слоях волосяного фолликула [3]. Непосредственное поражающее влияние вирусов

на клетки волосяных фолликулов не установлено. Посредством трансмиссионной электронной микроскопии изучали ультраструктуру волосяного фолликула, полученного из затылочной области с целью трансплантации у мужчины, перенесшего инфекцию COVID-19. Обнаружение предполагаемого коронавируса (вирусоподобных частиц с характерными морфологическими чертами) внутри клеток наружного и внутреннего эпителиального корневого влагалища, а также матрицы, оказалось случайной находкой. Тем не менее внутриклеточное выявление коронавируса в клетках волосяного фолликула у переболевшего COVID-19 пациента позволяет сделать предположение о возможности длительной персистенции вируса и непосредственном влиянии инфекции на рост и состояние волос.

Список литературы

1. Czech T., Sugihara S., Nishimura Y. Nishimura. characteristics of hair loss after COVID-19: a systematic scoping review // JCD. 2022. Vol. 21, N 9. P. 3655–3662. doi: 10.1111/jocd.15218
2. Rossi A., Magri F., Sernicola A., et al. Telogen effluvium after SARS-CoV-2 infection: a series of cases and possible pathogenetic mechanisms // Skin Appendage Disord. 2021. Vol. 21, N 5. P. 1–5. doi: 10.1159/000517223
3. Sattur S.S., Sattur I.S. COVID-19 infection: impact on hair // Indian J Plast Surg. 2021. Vol. 54, N 4. P. 521–526. doi: 10.1055/s-0041-1740289

Парфенова П.С. ✉, Красковская Н.А., Кольцова А.М., Шатрова А.Н., Хотин М.Г., Михайлова Н.А.

Получение и характеристика линий дермальных фибробластов для моделирования болезни Хантингтона

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ sucrederaisin@gmail.com

Аннотация. Распространенными моделями болезни Хантингтона (БХ) *in vitro* являются соматические дермальные фибробласты, репрограммированные в нейроны. Данная работа посвящена получению и характеристике линий фибробластов пациентов с БХ для дальнейшей дедифференцировки в нейрональные клетки.

Ключевые слова: фибробласты; клеточная линия; нейродегенеративные заболевания; болезнь Хантингтона.

Parfenova P.S., Kraskovskaya N.A., Koltsova A.M., Shatrova A.N., Khotin M.G., Mikhailova N.A.

Derivation and characterization of dermal fibroblast lines to model the pathogenesis of Huntington's disease

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Common *in vitro* models of Huntington's disease involve the reprogramming of somatic dermal fibroblasts into neurons. This study aims to obtain and characterize dermal fibroblast lines from patients with HD for further differentiation into neuronal cells.

Keywords: fibroblasts; cell line; neurodegenerative diseases; Huntington's disease.

Болезнь Хантингтона (БХ) представляет собой нейродегенеративное аутосомно-доминантное генетическое заболевание, этиология которого связана с экспансией CAG повторов в гене хантингтина (*Htt*). Продуктом экспрессии гена *Htt* является одноименный белок, детектирующийся практически во всех типах клеток тканей человека, однако его функциональная роль до сих пор остается невыясненной.

Данная работа посвящена получению и характеристике новой клеточной линии фибробластов пациента с БХ для ее дальнейшего изучения и дифференцировки в нейрон-подобные клетки. Из биоптата кожи пациента с БХ с 47 повторами CAG в гене *Htt* была выделена и охарактеризована линия дермальных фибробластов Hddf [1]. Полученная клеточная линия имеет нормальный кариотип, клетки линии демонстрирует положительное окрашивание на ряд поверхностных маркеров CD44, CD73, CD90 и CD105, характерных для мезенхимных стволовых клеток и фибробластов. Дермальные фибробласты линии Hddf демонстрируют высокую пролиферативную активность вплоть до 40-го пассажа. Для оценки клеточного старения линии Hddf, на 7, 20, 30 и 40 пассажах была проведена окраска SA β -gal, которая специфически выявляет стареющие клетки. Полученные результаты показали, что среднее количество окрашенных клеток на чашку Петри начинает расти на 30 пассаже и достигает своего максимума на 40-м пассаже. Проведено сравнение пролиферативной активности клеток линии Hddf и линии дермальных фибробластов DF1 от здорового донора, полученной из Коллекции клеточных культур позвоночных ИНЦ РАН. Используемые клеточные линии были подобраны в соответствии с полом и возрастом здорового донора и пациента с БХ, чтобы, в частности, исключить возраст-ассоциированные различия клеточного материала. Фибробласты линии Hddf имеют более высокий индекс пролиферации, чем клетки линии DF1, кроме того, их скорость миграции, измеренная в тесте «зарастание раны», также оказалась выше. Таким образом, полученная клеточная линия Hddf может быть использована для выяснения функций белка хантингтина в делящихся клетках, а также может выступать в роли «стартовых клеток» для получения индуцированных нейронов методами репрограммирования.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063.

Список литературы

1. Kraskovskaya N., Koltsova A., Parfenova P., et al. Dermal fibroblast cell line from a patient with the Huntington's disease as a promising model for studying disease pathogenesis: production and characterization // *Biochemistry (Moscow)*. 2024. Vol. 89, N 7. P. 1239–1250. doi: 10.1134/S000629792407006X

Первушин Н.В.^{1,2} ✉, Япрынцева М.А.^{1,2}, Бадлаева А.С.³, Шипунова В.О.^{4,5}, Маслова О.В.¹,
Нилов Д.К.⁶, Копейна Г.С.^{1,2}, Животовский Б.Д.^{1,2,7}

Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с приобретенной устойчивостью к антагонистам Mcl-1 и MDM2

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

⁴ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

⁵ Московский центр перспективных исследований, Москва, Россия

⁶ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁷ Отделение токсикологии, Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ rhododendron.nick@mail.ru

Аннотация. Развитие устойчивости к химиопрепаратам может изменять метаболический профиль и пролиферацию опухолевых клеток. В одной из линий, устойчивых к ингибированию Mcl-1, было увеличено клеточное дыхание. Клетки, устойчивые к ингибированию MDM2, обладали повышенным метаболизмом и пролиферацией.

Ключевые слова: Mcl-1; MDM2; таргетная терапия; лекарственная устойчивость; апоптоз; метаболизм; пролиферация.

Pervushin N.V.^{1,2}, Yapryntseva M.A.^{1,2}, Badlaeva A.S.³, Shipunova V.O.^{4,5}, Maslova O.V.¹, Nilov D.K.⁶,
Kopeina G.S.^{1,2}, Zhivotovsky B.^{1,2,7}

Metabolism and proliferation analysis of tumor cells with acquired resistance to Mcl-1 and MDM2 inhibitors

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Kulakov National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵ Moscow Center for Advanced Studies, Moscow, Russia

⁶ Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

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

Abstract. The development of resistance to chemotherapeutics may alter metabolic profile and proliferation of cancer cells. In one of the cell lines, resistant to Mcl-1 inhibition, respiration was elevated. Cells resistant to MDM2 inhibition were more metabolically active and faster-proliferative.

Keywords: Mcl-1; MDM2; targeted therapy; drug resistance; apoptosis; metabolism; proliferation.

Важной особенностью опухолевых клеток является избегание механизмов запуска программируемой клеточной гибели (ПКГ), в частности, блокирование активации апоптоза. В регуляции апоптоза особую роль играют белки семейства Bcl-2 и транскрипционный фактор p53. Представители белкового семейства Bcl-2 могут как способствовать, так и препятствовать запуску апоптоза. Так, повышение уровней

антиапоптотических белков (например, Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) часто лежит в основе устойчивости опухолевых клеток к активации апоптоза, в то время как подавление этих белков может быть привлекательной стратегией противоопухолевой терапии. В настоящее время селективный антагонист белка Bcl-2 (венетоклакс) одобрен для клинического применения в терапии гематологических опухолей, а ряд антагонистов Mcl-1 продолжают изучаться в клинических испытаниях.

Белок p53 отвечает за стабильность генома в нормальных и стрессовых условиях, препятствуя, тем самым, развитию онкологических заболеваний. Этот белок регулирует процессы клеточного старения, клеточный цикл, останавливает деление клеток после повреждения ДНК, а также способствует активации различных видов ПКГ, включая апоптоз. Мутации гена *TP53*, которые приводят к потере функциональной активности белка, детектируются примерно в половине случаев развития опухолей у человека. При этом такие злокачественные новообразования характеризуются неблагоприятным прогнозом лечения.

Убиквитин-лигаза MDM2 поддерживает низкий внутриклеточный уровень p53 за счет различных механизмов, главным из которых является протеасомная деградация p53. Нарушение взаимодействия MDM2 с p53 ведет к накоплению последнего и выражается в p53-зависимой активации экспрессии генов эффекторных (BAX) и регуляторных (PUMA/BBC3 и др.) проапоптотических белков семейства Bcl-2, что в результате обеспечивает нейтрализацию их антиапоптотических партнеров и последующую гибель злокачественных клонов за счет запуска апоптоза. Таким образом, блокирование MDM2 может быть эффективным способом подавления опухолей. На данный момент ингибиторы MDM2 активно исследуются в клинических испытаниях.

Серьезным недостатком использования многих лекарственных препаратов, в особенности противоопухолевых агентов целевого действия, является развитие приобретенной лекарственной устойчивости к ним, что ведет к потере их терапевтической эффективности. Селективные антагонисты Mcl-1 и MDM2 не являются исключением, и для данных соединений также был обнаружен этот эффект. Важно отметить, что, помимо снижения гибели в ответ на действие таргетного препарата, устойчивые опухолевые клетки могут приобрести дополнительные адаптационные преимущества: изменить свой метаболический профиль и пролиферативную активность.

В настоящей работе были получены три опухолевые клеточные линии различного происхождения, характеризующиеся повышенной устойчивостью к действию антагониста Mcl-1 S63845. В двух устойчивых популяциях клеток (аденокарциномы шейки матки HeLa и нейробластомы SK-N-Be(2)c) наблюдалось увеличение уровней других антиапоптотических белков — Bcl-2 или Bcl-xL и не происходило изменений в метаболической активности по сравнению с исходными линиями. В то время как в клетках аденокарциномы легкого H23 наблюдалась обратная картина: отсутствие изменений в профиле антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и повышение базального дыхания клеток. Во всех трех клеточных моделях не наблюдались различия в клоногенной активности между исходными и резистентными клонами. Таким образом, не только повышенное содержание антиапоптотических белков, но и усиление метаболизма могут вносить свой вклад в развитие устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.

Также была выведена клеточная линия нейробластомы SH-SY5Y, обладающая повышенной устойчивостью к действию антагониста MDM2 RG7388. При помощи различных *in vitro* и *in silico* методов было обнаружено, что причиной устойчивости является появление мутации в гене *TP53*, ведущей к аминокислотной замене His193Arg, которая встречается в различных типах опухолей. Устойчивые клетки SH-SY5Y по сравнению с исходными характеризовались как повышением гликолиза и клеточного дыхания, так и увеличением клоногенной активности. Более того, повышенная пролиферативная активность была продемонстрирована в *in vivo* экспериментах гистологическими (оценка клеточного обновления) и иммуногистологическими (окраска маркера Ki-67) методами. Полученные данные свидетельствуют, что развитие приобретенной устойчивости опухолевых клеток к подавлению MDM2 сопровождается значительными изменениями их метаболического профиля и пролиферации, что может способствовать увеличению объема опухолевой ткани и неблагоприятному прогнозу выживаемости у таких пациентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 23-74-30006).

Перепеченов С.С.¹ ✉, Титова А.А.¹, Тазетдинова Л.Г.¹, Филатов Н.С.¹, Билялов А.И.^{1,2},
Киясов А.П.¹, Гусев О.А.^{1,3}

Регенераторный потенциал *Acomys cahirinus* при исследовании травм скелетной мышечной ткани

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

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

³ ООО «ЛИФТ», Москва, Россия

✉ ssperepechenov@gmail.com

Аннотация. Мыши рода *Acomys* обладают уникальной способностью к регенерации. В связи с этим целью исследования было выявить реактивные изменения скелетных мышц в ответ на повреждения различного типа. Было выявлено, что регенераторный потенциал *Acomys cahirinus* зависит от типа повреждения мышечной ткани.

Ключевые слова: регенеративная медицина; модельные организмы; *Acomys cahirinus*; ишемия; хроническая ишемия; скелетная мышечная ткань.

Perepechenov S.S.¹, Titova A.A.¹, Tazetdinova L.G.¹, Filatov N.S.¹, Bilyalov A.I.^{1,2}, Kiyasov A.P.¹, Gusev O.A.^{1,3}

Regeneration potential of *Acomys cahirinus* mice for studying in skeletal muscles injury

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Moscow Clinical Scientific Center named after A.S. Loginov, Moscow, Russia

³ LLC "LIFT", Moscow, Russia

Abstract. Mice of the genus *Acomys* have a unique regenerative ability. In this regard the aim of the study was to identify the reactive changes of skeletal muscles in response to injuries of different types. We found that the regenerative potential of *Acomys* depends on the type of damage of skeletal muscles.

Keywords: regenerative medicine; model organisms; *Acomys cahirinus*; ischaemia; chronic ischaemia; skeletal muscle tissue.

В настоящее время существует множество различных патологий, поражающих скелетные мышцы (возрастные изменения, дистрофии различного генеза). Потеря нормальных функций скелетных мышц приводит к ранней инвалидизации у трудоспособных слоев населения и снижению общей работоспособности человека, что прямо отражается на экономической ситуации государства. Это делает мышечные патологии ярко выраженной медико-социальной проблемой. Уникальная способность к регенерации мышей рода *Acomys* позволяет использовать их как перспективный модельный организм [1–3] для оценки различных патологических состояний и изучения свойств регенерации мышечной ткани. Целью данного исследования было выявить реактивные изменения скелетной мышечной ткани в ответ на повреждения у мышей вида *Acomys cahirinus* и *Mus musculus*. В нашем исследовании приведено сравнение нескольких моделей повреждения: 1) модель химического повреждения (внутримышечное введение 50% р-ра глицерина); 2) одноэтапная «острая» ишемия (одноэтапное лигирование бедренной артерии); 3) двухэтапная «хроническая» ишемия (одноэтапное лигирование бедренной, через 7 дней лигирование подколенных артерий); 4) двухэтапная «критическая» ишемия (одномоментное лигирование бедренной и подколенных артерий). Животных выводили из эксперимента на 2, 5, 7 и 10-й дни. Выделенную икроножную мышцу делили на две части, одну часть фиксировали в 10% забуференном формалине, вторую замораживали в парах жидкого азота. Поперечные

парафиновые и криосрезы окрашивали гематоксилин и эозином, трихромом по Гоммори и NADH-TR. Модель химического повреждения показала, что после однократного внутримышечного введения 50% р-ра глицерина у всех животных со второго по пятый дни наблюдалась диффузная воспалительная инфильтрация, характеризующиеся наличием лимфоцитарных и макрофагальных клеток. На 7-й день и у мышей рода *Acomys cahirinus* и у *Mus musculus* появляются центральноеядерные мышечные волокна с сохранением очагов воспалительной инфильтрации того же генеза. На 10-й день эксперимента в срезах икроножной мышцы наблюдалось большое количество центральноеядерных мышечных волокон, а также проявлялось очаговое замещение жировой тканью. Однократное введение глицерина не показало существенной разницы между воспалительной реакцией и регенеративными способностями у мышей рода *Acomys cahirinus* и *Mus musculus*. Следующим этапом мы решили проверить модель одноэтапной «острой» ишемии. На второй день после лигирования у мышей рода *Mus musculus* наблюдалась воспалительная инфильтрация и некроз мышечных волокон. На 5-й день появились центральноеядерные мышечные волокна. К 10-му дню наблюдались небольшие очаги регенерации скелетной мышцы, представленные центральноеядерными мышечными волокнами. У *Acomys cahirinus* же на аналогичных сроках после моделирования мы наблюдали единичные округлые мышечные волокна с небольшими очагами перемизиальной инфильтрации на вторые и третьи сутки. На седьмой день наблюдалось появление центральноеядерных мышечных волокон, а к 10-му дню наблюдалось полное восстановление. Тем самым, скелетные мышцы *Acomys cahirinus* показали свою устойчивость к «острой» ишемии. Двухэтапное же, «хроническое» повреждение, вызвало воспалительную инфильтрацию и потерю полигональной формы мышечных волокон и у *Mus musculus* и у *Acomys cahirinus*. На пятые и седьмые сутки у мышей рода *Acomys cahirinus* появилось большое количество центральноеядерных мышечных волокон. К 10-му дню происходит почти полная регенерация икроножной мышцы и остаются лишь небольшие очаги регенерации центральноеядерных мышечных волокон, тогда как *Mus musculus* на 10-й день все еще сохраняет признаки ишемии, проявляющихся в жировом замещении ткани, сохранении очагов регенерации волокон и атрофии мышечных волокон. Однако при оценке результатов двухэтапной «критической» ишемии, нами не было обнаружено существенных различий между мышцами рода *Mus musculus* и *Acomys cahirinus*. В икроножных мышцах на вторые и третьи сутки наблюдалась диффузная и воспалительная инфильтрация с очагами некрозов. К седьмым суткам сохранялся устойчивый характер повреждений: диффузная воспалительная инфильтрация с появлением очагов регенерации, в виде появившихся центральноеядерных мышечных волокон. Как обобщение вышеизложенного можно сказать, что мыши рода *Acomys cahirinus* имеют больший регенераторный потенциал и устойчивы к острой и хронической ишемии скелетной мышечной ткани. Несмотря на это, *Acomys cahirinus* не показали существенных различий в устойчивости против «критической» ишемии или миотоксических агентов. Таким образом, регенераторный потенциал скелетной мышечной ткани *Acomys cahirinus* зависит от типа повреждения. Это делает его перспективным модельным животным для дальнейшего изучения процессов регенерации именно при хронических ишемиях нижних конечностей.

Список литературы

1. Brant J.O., Lopez M.C., Baker H.V., et al. A comparative analysis of gene expression profiles during skin regeneration in mus and acomys // PLoS One. 2015. Vol. 10, N 11. doi: 10.1371/journal.pone.0142931
2. Seifert A.W., Kiama S.G., Seifert M.G., et al. Skin shedding and tissue regeneration in African spiny mice (*Acomys*) // Nature. 2012. Vol. 489, N 7417. P. 561–565. doi: 10.1038/nature11499
3. Билялов А.И., Филимошина Д.Д., Филатов Н.С., и др. У мышей рода *Acomys* после травмы восстанавливается эластический хрящ ушной раковины // Гены и Клетки. 2022. Т. 17, № 1. С. 42–47. EDN: EKHSUG doi: 10.23868/202205003

Переpletчикова Д.А.¹✉, Басович Л.С.¹, Кучур П.Д.¹, Азаркина К.Е.¹, Смирнова Д.В.¹,
Боярская Н.В.¹, Карелкин В.В.², Малашичева А.Б.¹

Сложное взаимодействие между эндотелиальными клетками и остеобластами во время остеогенной дифференцировки

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ dasha_perepletch@mail.ru

Аннотация. Эндотелиальные клетки образуют тесную взаимосвязь с клетками костной ткани и способствуют формированию клеточной ниши. Данное исследование направлено на поиск паракринных и юкстракринных механизмов, участвующих в перекрестных взаимодействиях между эндотелиальными клетками и остеобластами.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки; остеобласты; остеогенная дифференцировка; перекрестные взаимодействия; сигнальный путь Notch.

Perepletchikova D.A.¹, Basovich L.S.¹, Kuchur P.D.¹, Azarkina K.E.¹, Smirnova D.V.¹,
Boyarskaya N.V.¹, Karelkin V.V.², Malashicheva A.B.¹

The complex interplay between endothelial cells and osteoblasts during osteogenic differentiation

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² RSRI of Traumatology and Orthopedics named after R.R. Vreden, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Endothelial cells form a close interaction with bone tissue cells and contribute to the formation of the cellular niche. This study aims to explore the paracrine and juxtacrine mechanisms involved in the cross-interactions between endothelial cells and osteoblasts.

Keywords: endothelial cells; osteoblasts; osteogenic differentiation; crosstalk; Notch signaling.

Функциональная целостность костной системы поддерживается за счет ключевых процессов: образовании новой костной ткани и ее ремоделировании, поддержании популяции костеобразующих клеток (мезенхимных стволовых клеток и остеобластов) и костерезорбирующих клеток (остеокластов), а также строгой регуляции их дифференцировки. На эти процессы в значительной степени влияет микроокружение, которое формируется благодаря непосредственной близости кровеносных сосудов [1, 2]. Эндотелиальные клетки (ЭК), выстилающие внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, обеспечивают транспорт кислорода и питательных веществ, образуют тесную взаимосвязь с клетками костной ткани и способствуют формированию особой клеточной ниши. В настоящее время взаимосвязь между клетками костной ткани и ЭК остается предметом активных исследований и дискуссий. И если раньше считалось, что основной механизм взаимодействия между ЭК и клетками костной ткани, связан с паракриной сигнализацией, которая включает в себя секрецию проангиогенных и остеогенных факторов, обеспечивающих функциональные реакции в обоих типах клеток [3]. То в последние годы появляются исследования, свидетельствующие о существовании прямого контакта между ЭК и клетками костной ткани и роли юкстакринной сигнализации при перекрестных взаимодействиях [4, 5]. Однако не ясно какую роль играют паракриная и юкстакринная сигнализация в дифференцировке клеток в остеогенном направлении. Данное исследование

направлено на поиск паракринных и юкстракринных механизмов, участвующих в перекрестных взаимодействиях между эндотелиальными клетками и остеобластами в контексте остеогенной дифференцировки клеток. Мы провели эксперименты по сокультивированию в условиях прямого и непрямого взаимодействия ЭК и первичных остеобластов человека при остеогенной индукции. На начальных этапах эффективность дифференцировки оценивали методом ПЦР-РВ по экспрессии остеогенных маркеров, терминальные стадии оценивали методом окраски ализариновым красным. В ходе первого этапа исследования мы выявили, что в зависимости от наличия или отсутствия прямого контакта остеобластов с ЭК при индукции остеогенной дифференцировки возможен, как остеоиндуктивный, так и остеосупрессивный эффект. На следующем этапе мы проанализировали протеомный и транскриптомный профиль остеобластов и ЭК при различных условиях сокультивирования. По результатам анализа главных компонент мы обнаружили формирование смешанных кластеров для остеобластов при различных условиях сокультивирования, как по транскриптомным, так и по протеомным данным. При этом кластеры групп остеобластов после бесконтактного сокультивирования и контрольных остеобластов были практически идентичны друг другу. Для ЭК в ходе анализа мы обнаружили различные кластеры, что свидетельствует о значительной реакции эндотелия на остеобласты. Мы определили, что раздельное сокультивирование стимулирует в ЭК продукцию различных ингибиторов сигнального пути BMP и экспрессию NO-синтазы. В контактном сокультивировании несмотря на то, что в ЭК после прямого сокультивирования мы выявили повышение экспрессии многих компонентов, выявленных и в бесконтактном культивировании, общая направленность реакции была совершенно иной. В контактном сокультивировании в ЭК происходит Notch-опосредованная активация генов остеогенной дифференцировки. Мы выявили значительное повышение экспрессии как компонентов Notch: NOTCH1, NOTCH3, DLL1, JAG1; так и генов-мишеней Notch: HEY1, HEY2, HEYL. Методом РВ-ПЦР мы также подтвердили, что при прямом сокультивировании увеличивается экспрессия: NOTCH1, NOTCH3, JAG1 и HEY1. Далее изучили, как подавление компонентов сигнального пути Notch в ЭК влияет на кальцификацию остеобластов. Для этого трансдуцировали ЭК одной из лентивирусных конструкций, несущих shRNA к генам Notch, затем сокультивировали модифицированные ЭК с остеобластами. Через 14 дней окрашивали ализариновым красным и определили, что подавление NOTCH1, NOTCH3 и MAML1 оказывает ингибирующее действие на кальцификацию. Затем мы провели транскриптомный анализ для ЭК, модифицированных активирующими и ингибирующими лентивирусными конструкциями NOTCH1 и NOTCH3 и получили данные по дифференциальной экспрессии генов. Полученные данные продемонстрировали пересечение кластеров shNotch1 и shNotch3, а также пресечение кластеров NICD1 и NICD3. Также мы обнаружили, что в зависимости от типа модификации изменяется экспрессия эндотелиальных маркеров, таких как vWF и CDH5. Полученные данные определяют двойственную роль ЭК в модуляции остеогенной дифференцировки и показывают особую роль Notch при контактных взаимодействиях. Мы надеемся, что наши данные позволят продвинуться в направлении понимания перекрестных механизмов, участвующих в регуляции остеогенной дифференцировки, как с целью остеоиндукции при репаративной регенерации костной ткани, так и для подавления остеогенной дифференцировки при патологической кальцификации тканей сердца и сосудов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ проекта 23-15-00320).

Список литературы

1. Grosso A., Burger M.G., Lunger A., et al. It takes two to tango: coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration // *Front Bioeng Biotechnol.* 2017. Vol. 5. ID 68. doi: 10.3389/fbioe.2017.00068
2. Sivan U., De Angelis J., Kusumbe A.P. Role of angiocrine signals in bone development, homeostasis and disease // *Open Biol.* 2019. Vol. 9, N 10. ID 190144. doi: 10.1098/rsob.190144
3. Stegen S., Carmeliet G. The skeletal vascular system — breathing life into bone tissue // *Bone.* 2018. Vol. 115. P. 50–58. doi: 10.1016/j.bone.2017.08.022
4. Ben Shoham A., Rot C., Stern T., et al. Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology // *Development.* 2016. Vol. 143, N 21. P. 3933–3943. doi: 10.1242/dev.139253
5. Cao C., Huang Y., Tang Q., et al. Bidirectional juxtacrine ephrinB2/Ephs signaling promotes angiogenesis of ECs and maintains self-renewal of MSCs // *Biomaterials.* 2025. Vol. 312. doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122752. Corrected and republished from: *Biomaterials.* 2018. Vol. 172. P. 1–13. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.042

Перетягин П.В. ✉, Соловьева А.Г.

Особенности микроциркуляции крови под влиянием озона в оценке репаративных процессов на модели дорсального кожного лоскута крыс

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

✉ peretyaginpv@gmail.com

Аннотация. Изучено воздействие озона на интенсивность локального микрокровотока крыс с оперативной моделью кожного лоскута для оценки репаративных процессов. Показано, что озонотерапия положительно влияет на показатели микроциркуляции крови при экспериментальной модели кожного лоскута, указывая на ее позитивное влияние на процессы регенерации в ране.

Ключевые слова: озон; микроциркуляция; регенерация.

Peretyagin P.V., Soloveva A.G.

Features of blood microcirculation under the influence of ozone in the assessment of reparative processes on the model of the dorsal skin flap of rats

Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. The effect of ozone on the intensity of local microcirculation in rats with an operational skin flap model to assess reparative processes was studied. It has been shown that ozone therapy has a positive effect on blood microcirculation parameters in an experimental skin flap model, indicating its positive effect on the regeneration processes in the wound.

Keywords: ozone; microcirculation; regeneration.

Введение. Поиск и оценка эффективности новых способов стимуляции репаративной регенерации кожи остаются одной из актуальных задач современной медицины. Применение озона с этой целью является целесообразным в связи с его высоким окислительно-восстановительным потенциалом, сопровождающим иммуномодулирующее, противовоспалительное, анальгезирующее, противогипоксическое действие [1]. В связи с этим важным является изучение механизмов действия озонотерапии на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы в целом и системы микроциркуляции в частности в условиях экспериментального окислительного стресса *in vivo*.

Целью работы явилась оценка влияния озонотерапии на микроциркуляцию крови крыс с оперативной моделью ишемии дорсального кожного лоскута *in vivo*.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовали 15 крыс-самцов линии Wistar массой 250–300 г. Животных разделили на 3 группы: 1 группа — интактная (здоровые крысы, $n = 5$), 2 группа — контрольная — оперированные животные без каких-либо воздействий ($n = 5$), 3 группа — опытная — оперированные животные с лечением озоном в послеоперационном периоде ($n = 5$). У крыс опытной и контрольной групп на спине под внутримышечным наркозом выкраивался кожный лоскут 3×10 см на питающей ножке с осевым типом кровообращения. Затем лоскут пришивался на место.

В послеоперационном периоде в течение 14 суток животным третьей группы кожный лоскут ежедневно обрабатывали озон-кремом с содержанием озонидов не менее 1500 мг O₂/кг и ежедневно внутривентрально вводили 1 мл 0,9% раствора NaCl с насыщающей концентрацией озона в кислород-озоновой смеси

от озонатора — 3000 мкг/л. На поверхности кожного лоскута у оперированных животных, а также в сопоставимых областях кожи здоровых животных изучали процессы микроциркуляции методом лазерной доплеровской флоуметрии на аппарате ЛАЗМА-МЦ (НПП «Лазма», Москва). Оценивали интегральный показатель микроциркуляции ПМ, перф.ед., который отражает средний поток эритроцитов в единице объема ткани за единицу времени [2]. Результаты исследований обрабатывали по программе Statistica 6.0.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученные данные ЛДФ по контрольной группе животных также совпали с клиническими результатами, согласно которым к 7 суткам после операции нарастали ишемические изменения. В среднем отделе лоскута регистрировалось снижение ПМ в 2 раза по сравнению с интактной группой. К 14 суткам в контрольной группе животных в среднем отделе лоскута значения ПМ снизились еще в 2 раза. В дистальном отделе у всех животных контрольной группы был зарегистрирован ПМ, равный нулю, что свидетельствовало о некротических изменениях в кожном лоскуте. В опытной группе животных зарегистрирована иная динамика микроциркуляторных изменений. По данным ЛДФ, в опытной группе на 7 сутки ПМ в среднем отделе лоскута по сравнению с исходным уровнем снизился незначительно, что свидетельствует о возможном адаптационном влиянии озона. Сравнительный анализ результатов ЛДФ метода показал, что в опытной группе животных с озоном, степень необратимых сосудистых изменений в лоскуте менее выражена по сравнению с контролем. Поскольку наиболее общими среди всех микроциркуляторных расстройств являются локальный спазм сосудов и снижение скорости кровотока, зарегистрированные данные подтверждают спазмолитический механизм действия озона на гладкомышечную сосудистую стенку животных.

Заключение. Выявлено позитивное влияние озонотерапии на функциональную активность микроциркуляторного русла крыс с оперативной моделью дорзального кожного лоскута *in vivo*. Результаты имеют важное прикладное значение для использования в комплексной медицинской реабилитации озонотерапии как инструмент для воздействия на репаративные процессы в очаге поражения в целях восстановления и поддержания тканевых структур.

Список литературы

1. Павлов Д.С. Озонотерапия в клинической практике // Физиотерапия, бальнеология и реабилитация. 2003. № 4. С. 49–54. EDN: ONMHSZ
2. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем: колебания, информация, нелинейность. Руководство для врачей. Москва: ЛИБРОКОМ, 2013. 496 с.

Першина О.В. ✉, Пахомова А.В., Рыбалкина О.Ю., Узьянбаев И.А., Федорова Е.П.,
Сандрикина Л.А., Соколова Л.А., Жданов В.В.

Стволовые опухолевые клетки — маркеры развития рака легкого при легочном фиброзе в эксперименте

НИИ фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга Томского НИМЦ РАН, Томск, Россия

✉ ovpershina@gmail.com

Аннотация. На экспериментальной модели сочетанной патологии идиопатического легочного фиброза и рака легкого показано, что стволовые опухолевые клетки, эндотелиальные клетки и фиброциты миелоидного происхождения могут являться маркерами развития рака легкого на фоне легочного фиброза.

Ключевые слова: стволовые опухолевые клетки; рак легкого; идиопатический легочной фиброз; эндотелиальные клетки; фиброциты.

Pershina O.V., Pakhomova A.V., Rybalkina O.Yu., Uzyanbaev I.A., Fedorova E.P., Sandrikina L.A., Sokolova L.A., Zhdanov V.V.

Cancer stem cells as markers of lung cancer development at the pulmonary fibrosis in an experiment

Goldberg ED Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Centre of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. Using an experimental model of combined pathology of idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer, it was shown that cancer stem cells, endothelial cells and fibrocytes of myeloid origin can be markers for the development of lung cancer against the background of pulmonary fibrosis.

Keywords: cancer stem cells; lung cancer; idiopathic pulmonary fibrosis; endothelial cells; fibrocytes.

В современной научной литературе все чаще встречаются доказательства, того что стволовые опухолевые клетки (СОК) имеют решающее значение в возникновении и прогрессировании опухолевых заболеваний, и могут являться перспективной терапевтической мишенью при различных видах рака [1]. Однако в настоящее время идентификация СОК представляет собой определенные сложности: отсутствуют валидированные способы их выделения, нет специфических маркеров у этого класса клеток. Поиск маркеров возникновения опухолевого процесса особенно важен при заболеваниях, которые сами по себе могут являться факторами риска развития канцерогенеза. В частности идиопатический легочной фиброз (ИЛФ) увеличивает риск развития немелкоклеточного рака легкого (РЛ) на 7–20% [2]. Выяснение механизмов, посредством которых ИЛФ приводит к увеличению заболеваемости и смертности от РЛ может выявить новые предикторы заболеваний и оптимизировать лечение [2]. Предполагают существование общих молекулярных путей, определяющих развитие ИЛФ и РЛ, таких как каскад факторов роста, пролиферативные и проангиогенные пути, воспалительные процессы [2]. Поэтому исследование СОК может помочь в ранней диагностике онкологических заболеваний особенно на фоне ИЛФ [2]. Растущие данные указывают на важную роль других клеточных популяций, которые также претерпевают изменения в контексте фиброза (фибробласты, эндотелиальные клетки и др.), что тоже может способствовать развитию и/или прогрессированию как ИЛФ, так и РЛ. Для разработки эффективных технологий лечения пациентов с легочным фиброзом, осложненным раком легкого, нацеленных на регенерацию травмированных тканей и обладающих противоопухолевой активностью, необходимо использовать адекватную экспериментальную модель, сочетающую в себе симптоматику легочного фиброза и РЛ. Нами была разработана и апробирована в эксперименте модель, позволяющая оценить

особенности развития сочетанной патологии ИЛФ и РЛ. ИЛФ вызывали однократным интратрахеальным введением блеомицина (БЛМ) мышам-самцам линии C57BL/6, день введения БЛМ принимали за 0-й день эксперимента. На 15 сутки после введения БЛМ подкожным введением суспензии клеток карциномы легкого Льюис (КЛЛ) моделировали РЛ. Материал для исследования забирали на 28-й день эксперимента. Проводили гистологическое исследование легочной ткани, цитометрически изучали содержание СОК и эндотелиальных клеток (ЭК), фиброцитов в крови и легких мышей. В легочной ткани мышей на фоне моделирования ИЛФ и РЛ наблюдалось усиление патологических изменений в легких по сравнению с каждой патологической ситуацией в отдельности. В то же время отмечалось достоверное увеличение площади соединительной ткани в легком у мышей группы с сочетанной патологией, которое было более выражено, чем в группах с каждой патологией в отдельности. В основе нарушений в легких в группе животных с ИЛФ и РЛ лежали повышенная миграция из крови в легкие популяций CD309⁺ ЭК, как гемопозитического, так и негемопозитического происхождения, уменьшение миграции CD31⁺ ЭК негемопозитического происхождения, а также увеличение гемопозитических стволовых клеток (ГСК) в крови и легких, возрастание в легочной ткани СОК, экспрессирующими маркерами CD90, CD117, CD274, CD276 и EGFR в различных сочетаниях. На настоящий момент EGFR, CD90 и CD117 являются наиболее хорошо задокументированными маркерами СОК при РЛ [1, 3]. Ранее нами также было показано, что количество клеток, экспрессирующих Axl, CD87, CD90, CD117, Sox2, EGFR, CD274, CD276, CD279, в крови пациентов с мелкоклеточным РЛ было увеличено [4]. Согласно одной из современных теорий важную роль в возникновении, и ИФЛ, и РЛ, играют фибробласты [2]. Источником увеличения пула миофибробластоподобных клеток могут служить клетки альвеолярного типа II и циркулирующие фиброциты, которые мигрируют из костного мозга в легкие и также могут являться мезенхимальными клетками-предшественниками. В наших экспериментах мы наблюдали увеличение клеток альвеолярного типа II и фиброцитов в легких мышей с сочетанной патологией. Следует подчеркнуть, что в отличие от группы только ИЛФ, в группах животных с РЛ и с сочетанной патологией в крови мышей наблюдалось увеличение фиброцитов, CD309⁺ ЭК и СОК. Таким образом, совместное последовательное использование БЛМ и клеток КЛЛ приводит к формированию сочетанной патологии ИЛФ и РЛ, взаимно усиливающих друг друга, как на клеточном, так и на организменном уровне. Биомаркерами, подтверждающими развитие опухоли, могут являться популяции СОК, эндотелиальных клеток, ГСК, фиброциты миелоидного происхождения.

Список литературы

1. Maiuthed A., Chantarawong W., Chanvorachote P. Lung cancer stem cells and cancer stem cell-targeting natural compounds // *Anticancer Research*. 2018. Vol. 38, N 7. P. 3797–3809. doi: 10.21873/anticancer.12663
2. Ballester B., Milara J., Cortijo J. Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: mechanisms and molecular targets // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, N 3. P. 593. doi: 10.3390/ijms20030593
3. Walcher L., Kistenmacher A.K., Suo H., et al. Cancer stem cells-origins and biomarkers: perspectives for targeted personalized therapies // *Front Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 1280. doi: 10.3389/fimmu.2020.01280
4. Skurikhin E.G., Ermakova N., Zhukova M., et al. Analysis of circulating tumor and cancer stem cells provides new opportunities in diagnosis and treatment of small cell lung cancer // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 18. P. 10853. doi: 10.3390/ijms231810853

Першин В.И. ✉, Кирпичева А.С., Новикова А.А., Широкова О.М., Мухина И.В.

Исследование морфофункциональных характеристик гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга минипига

Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

✉ vladimirpershin@gmail.com

Аннотация. Гидрогели на основе децеллюлированного матрикса мозга являются возможными кандидатами для разработки тканезаместительной терапии черепно-мозговой травмы. В ходе исследования морфофункциональных свойств гидрогеля было выявлено, что изучаемый биоматериал в основном содержит коллаген и гликопротеины, а также лишен иммуногенности в рамках планируемой к использованию в клинике черепно-мозговой травмы концентрации.

Ключевые слова: децеллюлированный матрикс; ВКМ; черепно-мозговая травма; мозг; морфология; иммуногенность.

Pershin V.I., Kirpicheva A.S., Novikova A.A., Shirokova O.M., Mukhina I.V.

Morpho-functional evaluation study of hydrogel based on decellularised brain matrix of mini pig

Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. Hydrogels based on decellularized brain matrix are essential biomaterials in the research field of regenerative biomedicine. In this study, morphofunctional properties of the hydrogel were investigated. The hydrogel contains collagen and glycoproteins and there is no immunogenic reaction within the concentration planned for use.

Keywords: decellularised matrix; ECM; TBI; brain; morphology; immunogenicity.

Черепно-мозговая травма является распространенным нарушением центральной нервной системы, зачастую приводящую к инвалидизации населения, которое крайне трудно лечить. В последнее время, основной акцент исследований сделан на разработку и использование биополимерных композиций, пригодных для тканезаместительной терапии. Данные биоматериалы, обладают рядом перспективных преимуществ, потому как они обладают максимальным сочетанием функциональности и безопасности.

Особое место среди данных материалов занимают биоматериалы на основе внеклеточного матрикса (ВКМ), т.к. молекулярный ансамбль децеллюлированного ВКМ, с одной стороны, участвует в пролиферации, миграции, дифференцировке клеток, поддержании связей между клетками, создает основу в механику микроокружения, с другой стороны, лишен или обладает крайне низкой иммуногенностью, высоким уровнем биосовместимости, а также, по совокупности свойств и структуры, практически идентичен нативной ткани.

Целью исследования являлась оценка влияния морфофункциональных свойств гидрогеля на основе децеллюлированного внеклеточного матрикса (дцВКМ) головного мозга свиньи.

Гидрогель на основе децеллюлированного матрикса мозга минипига был получен по методу [1] с небольшими изменениями. Для оценки морфоструктурных свойств гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга были применены следующие методики: гистологическое окрашивание парафиновых срезов децеллюлированного матрикса суданом III, альциановым синим и основанием Шиффа, трихромом по Маллори, флуоресцентным красителем DAPI, а также оценка ультраструктуры с помощью сканирующего электронного микроскопа. Для оценки функциональных свойств была проведена оценка иммуногенности методом ИФА против иммуноглобулинов IgG, IgM при внутрибрюшинном введении гидрогеля (в концентрации 10 и 20 мг/мл) мышам линии C57Bl/6 на 7, 14, 21 сутки.

В результате окрашивания суданом III было обнаружено, что по сравнению с нативной тканью мозга, децеллюлированный матрикс лишен липидов в составе. При окрашивании флуоресцентным красителем DAPI было выявлено, что в препарате децеллюлированного матрикса отсутствуют ядра, что говорит о полном удалении клеток из ткани. Комбинированное окрашивание альциановым синим с основанием Шиффа выявило сохранение кислых гликозаминогликов и гликопротеинов в составе биоматериала. Окрашивание трихром-Маллори и ультраструктурная оценка с использованием сканирующего электронного микроскопа выявило, что структура децеллюлированного матрикса мозга представляет из себя белковые волокна на основе коллагена. Оценка иммуногенности гидрогеля на основе децеллюлированного матрикса мозга свиньи показало отсутствие статистически значимых отличий в концентрации антител против IgG на всех рассматриваемых временных точках. При оценке изменения уровня содержания антител против IgM в максимальной концентрации (20 мг/мл) было обнаружено статистически значимое повышение уровня антител только на 14 сутки относительно контроля.

Полученные данные показывают, что гидрогель на основе децеллюлированного матрикса мозга в планируемой к использованию концентрации лишен иммуногенных свойств, однако в максимальной концентрации данный продукт обладает потенциальной иммуногенностью, что указывает на необходимость проведения повторной оценки иммуногенности в условиях смоделированной черепно-мозговой травмы.

Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания МЗ РФ № 121030100282-6.

Список литературы

1. Simsa R., Rothenbücher T., Gürbüz H., et al. Brain organoid formation on decellularized porcine brain ECM hydrogels // PloS one. 2021. Vol. 16, N 1. ID e0245685. doi: 10.1371/journal.pone.0245685

Петинати Н.А.¹✉, Садовская А.В.^{1,2}, Шипунова И.Н.¹, Дорофеева А.И.¹, Дризе Н.И.¹, Васильева А.Н.¹,
Алешина О.А.¹, Карасева Л.А.¹, Покровская О.С.¹, Кузьмина Л.А.¹, Паровичникова Е.Н.¹

Влияние сыворотки крови больных острыми лейкозами на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки здоровых доноров

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

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

✉ loel@mail.ru

Аннотация. Сыворотки крови больных острыми лейкозами (ОЛ) двукратно ингибируют пролиферацию мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) здоровых доноров. В организме больных ОЛ выявлены системные изменения гомеостаза, приводящие к нарушению роста основных регуляторов кроветворения — МСК.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; сыворотки крови; острые лейкозы; пролиферация.

Petinati N.A.¹, Sadovskaya A.V.^{1,2}, Shipunova I.N.¹, Dorofeeva A.I.¹, Drize N.I.¹, Vasilyeva A.N.¹,
Aleshina O.A.¹, Karaseva L.A.¹, Pokrovskaya O.S.¹, Kuzmina L.A.¹, Parovichnikova E.N.¹

The influence of blood serum from patients with acute leukemia on multipotent mesenchymal stromal cells of healthy donors

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Blood sera from patients with acute leukemia (AL) inhibit the proliferation of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) from healthy donors twofold. In AL patients, blood serum composition is significantly altered resulting in upset homeostasis and disruption of the growth of the main regulators of hematopoiesis — MSCs.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells; blood serum; acute leukemia; proliferation.

Кроветворение в организме поддерживается стромальным микроокружением, в состав которого входят МСК. МСК дают начало всем остальным клеткам стромы, участвуют в регуляции и поддержании кроветворения. Из костного мозга (КМ) здоровых доноров легко можно получить МСК стандартным методом. Попытки получить МСК из КМ больных ОЛ удаются не всегда. Рост МСК в культуре не коррелирует с количеством бластных клеток в периферической крови и КМ больных ОЛ. Проанализировано влияние сывороток крови (СК) пациентов на рост МСК в культуре. МСК здоровых доноров на 2–3 пассаже рассеивали по 1000 клеток на ячейку 96-луночного планшета и культивировали в течение 7 дней в среде α -МЕМ в присутствии 10% СК здоровых доноров или больных ОЛ при 37°C и 5% CO₂. С помощью МТТ-теста по уровню дыхания определяли количество клеток в лунке. Пролиферация МСК здорового донора достоверно ниже в присутствии СК больных ОЛ по сравнению с СК доноров. СК больных, из КМ которых не были получены МСК, угнетали пролиферацию донорских МСК достоверно сильнее, чем СК тех, из КМ которых были получены культуры МСК. Исследование концентрации цитокинов в СК больных ОЛ выявило повышенное содержание ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-7, ИЛ-13 и МIP-1b, что указывает на процесс воспаления при ОЛ. Эти результаты дали толчок к анализу СК 141 пациента с ОЛ (72 с острым миелоидным лейкозом, ОМЛ, и 69 с острым лимфобластным лейкозом, ОЛЛ) до начала лечения и по достижению ремиссии; 36 образцов СК пациентов с ОЛ до и после

аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) (20 ОМЛ и 17 ОЛЛ); 21 больного миелодиспластическим синдромом (МДС). В качестве контроля были использованы СК 16 здоровых доноров. Во всех экспериментах рост МСК здоровых доноров был лучше в присутствии СК доноров, чем СК пациентов. Среднее число МСК после культивирования составило для СК доноров — 6407 ± 188 клеток; больных ОМЛ в дебюте — 2361 ± 138 , в ремиссии — 3346 ± 104 ; больных ОЛЛ в дебюте — 2751 ± 133 , в ремиссии — 3640 ± 123 ; больных МДС — 3681 ± 213 клеток. Т.е. в среднем клетки росли в 2 раза хуже в присутствии СК больных в дебюте заболевания, и способность СК больных поддерживать рост МСК не восстанавливалась в ремиссии. При сравнении исходов лечения пациентов, из КМ которых росли и не росли МСК, оказалось, что из 48 больных, у которых МСК не выросли в дебюте заболевания, умерли 18,8%, тогда как из 102 больных, у которых МСК выросли, умерли 10,2%. При анализе другой выборки СК пациентов были выявлены достоверные ($p = 0,016$) различия между количеством выросших клеток в присутствии СК выживших ($N = 74$) и не выживших ($N = 20$) пациентов с ОЛ. После алло-ТГСК СК больных ОЛ поддерживает рост МСК здоровых доноров хуже, чем в ремиссии до трансплантации. Среднее число МСК после культивирования составило для СК доноров — 6407 ± 188 клеток; больных ОМЛ до алло-ТГСК — 5140 ± 92 , после алло-ТГСК — 3410 ± 107 ; больных ОЛЛ до алло-ТГСК — 5868 ± 382 , после алло-ТГСК — 2829 ± 73 клеток. Эти данные указывают на то, что тяжелая химиотерапия, необходимая для кондиционирования больного до алло-ТГСК, влияет на рост МСК. В организме больных ОЛ происходят системные нарушения, что отражается и на составе СК. Показано отсутствие достаточного количества ростовых факторов, необходимых для роста МСК, или наличие ингибитора роста этих клеток в СК пациентов с ОЛ. Наибольшие нарушения отмечаются у пациентов в дебюте ОЛ, по мере лечения их СК улучшают способность поддерживать рост МСК, однако восстановления этого параметра до уровня здоровых доноров все равно не происходит. С этим могут быть связаны цитопении, от которых страдают пациенты с ОЛ после лечения, в том числе после трансплантации. Пока неизвестно, какие точно клетки ответственны за секрецию в кровь факторов, эффект которых мы наблюдаем. Полученные результаты указывают, что способность СК поддерживать рост МСК может служить показателем общего состояния организма.

Петракова Н.В.¹ ✉, Зобкова Ю.О.¹, Пенкина Т.Н.¹, Комлев В.С.¹, Свиридова И.К.²,
Ахмедова С.А.², Сергеева Н.С.²

Медьсодержащие трикальцийфосфаты с антибактериальной активностью для замещения костных дефектов

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, Россия

✉ petrakova.nv@mail.ru

Аннотация. В работе получены керамические гранулы на основе трикальцийфосфата с замещением ионов кальция на ионы меди в широком ряду концентраций: от 0,5 до 40%. Показано, что составы с концентрацией меди до 20% проявляют антибактериальную активность, цитосовместимы, обладают выраженными матричными для клеток свойствами.

Ключевые слова: трикальцийфосфат; медь; модификация; биоматериалы; антибактериальная активность; цитосовместимость.

Petrakova N.V.¹, Zobkova Yu.O.¹, Penkina T.N.¹, Komlev V.S.¹, Sviridova I.K.², Akhmedova S.A.², Sergeeva N.S.²

Copper-containing tricalcium phosphates with antibacterial activity to replace bone defects

¹ A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² P.A. Herzen Moscow Research Oncology Institute, Branch of FSBI National Medical Research Radiological Centre, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. In the work, ceramic granules of copper-doped tricalcium phosphate in a wide range of Cu concentrations, up to 40%, were obtained. It has been shown that compounds with a copper amount up to 20% exhibit antibacterial activity, biocompatibility, and pronounced matrix properties for cells.

Keywords: tricalcium phosphate; copper; doping; biomaterials; antibacterial activity; cytocompatibility.

В отрасли высокотехнологичного производства медицинских изделий, предназначенных для восстановления дефектов костной ткани в областях травматологии, ортопедии, онкологии челюстно-лицевой хирургии, наблюдается значительный рост спроса. В данном сегменте востребованы синтетические кальцийфосфатные биоматериалы за счет их биосовместимости, отсутствия антигенности, высокой остеогенной потенции, доступности и удобства при клиническом применении. Ортофосфаты кальция в виде пористых скаффолдов или крошки являются многообещающими биоматериалами благодаря возможности модификации фазового состава и структурных характеристик, влияющих на скорость биорезорбции, согласованность процессов остеогенеза и деградации материала имплантата. Такие материалы могут обеспечить дополнительные терапевтические свойства в виде локального антибактериального эффекта, направленного на профилактику воспалительных осложнений в послеоперационный период.

Данная работа направлена на разработку биосовместимых биорезорбируемых материалов на основе ортофосфата кальция, обладающих антибактериальной активностью за счет содержания меди в ионной форме. Ортофосфат кальция, а именно трикальцийфосфат (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), является клинически признанным остеопластическим материалом вследствие его биосовместимости, обусловленной химическим сходством с минеральным компонентом костной ткани. В свою очередь, это определяет свойства биорезорбируемости

и биоактивности — за счет ионного обмена с жидкостями организма в приповерхностных областях иницируются процессы растворения и осаждения нового низкозакристаллизованного апатитоподобного слоя, благоприятного для последующего формирования нативной костной ткани.

Химическая модификация ТКФ осуществлена путем катионного замещения ионов кальция на ионы меди (Cu-ТКФ). Соединения получены осаждением из водных растворов нитрата кальция, нитрата меди, гидрофосфата аммония. Использован широкий концентрационный ряд допанта: 0; 0.5; 1; 5; 10; 20; 40% меди (относительно атомов кальция). В работе проведено комплексное исследование влияния ионов меди на структурно-морфологические характеристики ТКФ и биологические свойства *in vitro*.

Порошки Cu-ТКФ после синтеза идентифицировали как гексагональный гидроксипатит (ГА) с долей аморфной фазы. Во всем ряду составов медь содержится практически в полном количестве от расчетного. Термообработка до 900°C приводит к формированию структуры витлокита гексагональной модификации (β -ТКФ), а при повышенных концентрациях меди — к образованию значительного количества двойного фосфата кальция-меди моноклинной модификации. Введение меди приводит к термической стабильности β -ТКФ вплоть до 1400°C.

В исследовании выхода ионов в растворе СБФ в модели «замкнутой системы» на образцах в форме керамических пористых гранул различного размера (от 300 до 1000 мкм) в сроки до 4 мес. зарегистрировано высвобождение ионов меди из материала — незначительное для концентраций меди до 10% (единицы ppm) и более интенсивное для концентраций 20–40% (десятки ppm). Вместе с этим происходит адсорбция ионов кальция и фосфата из раствора и формирование низкозакристаллизованного кальцийфосфатного слоя на поверхности материала.

В исследованиях *in vitro* экспериментальных образцов керамических гранул Cu-ТКФ на модели перививной клеточной линии остеосаркомы человека MG-63 методом непрямого контакта в сроки 1–3 сут. культивирования показано отсутствие токсичности разработанных материалов в диапазоне концентраций меди 0,5–20% и острая токсичность материала с содержанием меди 40%. При прямом контакте клеток с данными образцами в сроки 1, 3, 7 и 10 сут. культивирования продемонстрирована цитосовместимость и выраженные матричные свойства поверхности образцов Cu-ТКФ в дозависимой манере в ряду концентраций меди от 0,5 до 10%.

Антибактериальную активность исследовали методом наложения экспериментальных образцов в виде керамических дисков диаметром 5 мм на свежесозданный бактериальный газон. Образцы тестировали на клинических штаммах грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* и грамположительных бактерий *Micrococcus luteus*. Установлено, что образцы Cu-ТКФ эффективны в отношении всех тестируемых штаммов. По результатам диско-диффузионного метода диаметр зоны подавления роста во всех группах возрастал с увеличением концентрации меди в образцах, наиболее интенсивно в тесте на *P. aeruginosa* (12 мм для Cu-ТКФ с 5% меди; 17 мм для Cu-ТКФ с 20% меди).

Таким образом, получены керамические пористые гранулы на основе медьсодержащих трикальцийфосфатов; показаны их цитосовместимость, антибактериальная активность и матричные свойства поверхности в дозависимой манере. Разработанные материалы являются перспективными для дальнейшего исследования их остеопластических потенциалов *in vivo* с целью использования в регенеративной медицине.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-63-10056, <https://rscf.ru/project/23-63-10056/>.

Петрова Е.С. ✉, Колос Е.А.

Изучение резидентных макрофагов эндоневрия седалищного нерва крысы

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

✉ iempes@yandex.ru

Аннотация. В течение нескольких часов после травмы седалищного нерва крысы в эндоневрии наблюдается активация Iba1⁺ резидентных макрофагов. Это может свидетельствовать о том, что именно эти клетки первыми реагируют на повреждение и запускают последующие дегенеративные и репаративные процессы в нерве.

Ключевые слова: нерв; травма; резидентные макрофаги эндоневрия; Iba1; иммуногистохимия.

Petrova E.S., Kolos E.A.

Study of resident macrophages in the endoneurium of the rat sciatic nerve

Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The activation of Iba1⁺ resident macrophages is observed in the rat sciatic nerve endoneurium for several hours after injury. This may indicate that resident macrophages are the first to respond to nerve damage and regulate subsequent degenerative and reparative processes in the nerve.

Keywords: nerve; injury; endoneurium resident macrophages; Iba1; immunohistochemistry.

Для разработки и совершенствования различных способов восстановления периферических нервных проводников (электростимуляции, применения магнитного поля, шовной техники, генной терапии и др.) необходимы углубленные исследования молекулярно-клеточных механизмов дегенеративных и репаративных процессов, происходящих в нерве после повреждения [1]. В настоящее время наименее изученными являются самые ранние сроки после повреждения, в частности, после механической травмы. Нет ясности относительно пусковых механизмов процессов валлеровской дегенерации, развивающейся в дистальном сегменте нерва после повреждения [2]. Мало данных о том, какие клетки эндоневрия первыми реагируют на повреждение аксонов: шванновские клетки, макрофаги, нейтрофилы или другие.

Цель настоящей работы — исследование реакции резидентных макрофагов эндоневрия седалищного нерва крысы на механическую травму. Работа выполнена на крысах Вистар-Киото массой 200–250 г ($n = 15$). При работе с животными соблюдали международные правила Европейского сообщества по гуманному обращению с экспериментальными животными. Исследование было одобрено Локальным этическим комитетом Института экспериментальной медицины (протокол № 2/22 от 06.04.2022). Седалищный нерв крыс повреждали путем наложения лигатуры в течение 40 с. В разные сроки после операции (1, 3, 6 час) фрагменты нервов фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах. После депарафинирования срезов макрофаги эндоневрия идентифицировали с помощью поликлональных козьих антител к кальций-связывающему белку Iba-1 (AbCam, Великобритания), маркеру мононуклеарных фагоцитов. Используя программу ImageJ, измеряли процент площади изображения, занятой структурами с положительной реакцией на белок Iba1. Установлено, что процент площади, занимаемой Iba1⁺ макрофагами, увеличивается в месте наложения лигатуры вдвое по сравнению с интактным нервом уже через 1 час после операции и продолжает возрастать через 3 и 6 часов. После повреждения

нерва большинство Iba1-позитивных эндоневральных макрофагов увеличивается в размерах, их отростки разветвляются и утолщаются по сравнению с резидентными макрофагами интактного нерва. Как известно, травма нервных проводников приводит к развитию процессов валлеровской дегенерации: деструкции аксонов и миелиновых оболочек, миграции гематогенных макрофагов, дедифференцировке шванновских клеток и др. Показано, что в ранние сроки после травмы из поврежденных сосудов в эндоневрий мигрируют нейтрофилы [3]. Они присутствуют там непродолжительное время и, по мнению некоторых авторов, участвуют в регуляции развития дегенеративных и репаративных процессов, рекрутируя гематогенные макрофаги [3]. В настоящей работе показано, что активация резидентных макрофагов начинается через 1 час после травмы. Нейтрофилы в эндоневрии поврежденного нерва в этот срок еще отсутствуют, отдельные клетки встречаются лишь в кровеносных сосудах эпиневральной оболочки. Полученные данные свидетельствуют о том, что роль резидентных макрофагов, а не нейтрофилов, может быть определяющей для дальнейших репаративных процессов, развивающихся в поврежденном нерве, и ее следует учитывать при разработке клеточной и генной терапии для стимуляции восстановления периферических нервных проводников.

Список литературы

1. Koeppen A.H. Wallerian degeneration: history and clinical significance // *J Neurol Sci.* 2004. Vol. 220, N 1–2. P. 115–117. doi: 10.1016/j.jns.2004.03.008
2. Petrova E.S. Cell technologies in experimental therapy of nerve injuries (problematic-analytical review) // *Biol Bull Rev.* 2022. Vol. 12, N 2. P. 195–206. doi: 10.1134/S2079086422080060
3. Lindborg J.A., Mack M., Zigmund R.E. Neutrophils are critical for myelin removal in a peripheral nerve injury model of wallerian degeneration // *J Neurosci.* 2017. Vol. 37, N 43. P. 10258–10277. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2085-17.2017

Пикина А.С. ✉, Еремеев А.В.

Модельная система гематоэнцефалического барьера на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

Федеральный научно-клинический центр Физико-химической медицины им. акад. Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

✉ arina.pikina@yandex.ru

Аннотация. Мы разработали модель ГЭБ человека, используя биомиметичный подход дифференцировки ИПСК. Модель воспроизводит ключевые характеристики данной структуры, что делает её перспективной для изучения нейродегенеративных заболеваний и скрининга потенциальных лекарственных агентов.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); гематоэнцефалический барьер (ГЭБ); моделирование *in vitro*; планшеты со вставками.

Pikina A.S., Ereemeev A.V.

Model system of the blood-brain barrier based on induced pluripotent stem cells

Federal State Budgetary Institution, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. We have developed a human blood-brain barrier (BBB) model using a biomimetic approach of induced pluripotent stem cell (iPSC) differentiation. This model replicates key characteristics of the BBB, making it promising for studying neurodegenerative diseases and screening potential drug candidates.

Keywords: induced pluripotent stem cells (iPSCs); blood-brain barrier (BBB); modeling *in vitro*; transwell plates.

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) представляет собой основную структуру, ответственную за контроль обмена соединениями между кровотоком и тканью головного мозга (ГМ), регулируя гомеостаз центральной нервной системой (ЦНС). Сложность доступа к ткани ГМ человека создаёт препятствия как для фундаментальных исследований функции, развития ГЭБ и роли этой структуры в патогенезе различных нейродегенеративных заболеваний, так и для решения практических задач в рамках разработки и тестирования терапевтических агентов. В связи с этим активно развивается моделирование ГЭБ. Однако, ставший традиционным метод перфузии сосудистого русла ГМ лабораторных животных и полученные с его помощью численные данные о проницаемости ГЭБ, сейчас всё чаще подвергаются критике ввиду ограничений, связанных с межвидовыми различиями [1]. Поэтому всё больше внимания уделяется разработке клеточных моделей человека, а индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) являются наиболее многообещающим инструментом для моделирования. В контексте важности микроокружения и синергии молекулярных событий при барьерогенезе поиск и разработка подходов, удовлетворяющих требованиям биомиметичности, то есть воссоздания нативных процессов *in vitro*, представляется особенно актуальным. Среди основных стратегий создания такого протокола можно выделить совместное культивирование клеток нейрососудистой единицы ГЭБ, обеспечение трёхмерных условий и комбинацию факторов дифференцировки в соответствии с логикой молекулярных процессов развития ГЭБ. Эти и другие подходы позволяют получать дифференцированные производные ИПСК, подобные эндотелиальным клеткам микрососудистого русла ГМ, с высокими барьерными свойствами, однако в стандартизации и достижении высокой воспроизводимости необходимы дальнейшие усилия. В этом исследовании представлена новая биомиметическая модель ГЭБ человека *in vitro*, созданная на платформе планшетов со вставками Transwell с применением дифференцированных

производных ИПСК. Используя потенциал ИПСК для воспроизведения различных типов клеток, мы создали модель, по молекулярным событиям имитирующую принципы барьерогенеза *in vivo* [2, 3]. Ключевой особенностью нашего подхода является непосредственный контакт между нейрональными и эндотелиальными производными в контролируемой среде, что позволяет более точно отражать физиологические условия. В результате, мы детектировали, что дифференцированные производные ИПСК в системе планшетов со вставками экспрессируют характерные маркеры клеток ГЭБ, включая нейрональный белок β 3-тубулин, поверхностные молекулы эндотелиев CD31, CD105, белки плотных контактов клаудин-5, окклюдин и ZO-1, а также транспортёры GLUT-1, LAT-1 и P-gp. Кроме того, модель демонстрировала высокую степень герметичности, что проявлялось в формировании трансэндотелиального сопротивления $1980 \pm 18 \text{ Омсм}^2$ [4] и низкой проницаемости для флуоресцентного декстрана (40 кДа) и митохондриального красителя (672 Да). Мы также показали, что данная платформа позволяет изучать влияние воспаления на функции ГЭБ путем индукции цитокинами и оценки изменения проницаемости для моноклеаров крови и макрофагоподобных клеток. Так, в присутствии IFN γ и TNF общая герметичность клеточного слоя снижалась, а относительная инвазия иммунных клеток возрастала. Таким образом, полученная модельная система демонстрировала чувствительность к провоспалительным цитокинам. Также мы выявили позитивное влияние нейронального компонента при совместном культивировании на формирование трансэндотелиального сопротивления и низкой проницаемости по отношению к малым липофильным молекулам митохондриального красителя. Оптимизация и масштабирование данной модели открывают возможности для стандартизированного изучения ГЭБ человека и разработки новых терапевтических стратегий для заболеваний ЦНС.

Исследование выполнено в рамках государственного задания № 122032300191-2 «Органоид-22».

Список литературы

1. Raut S., Bhalerao A., Noorani B., et al. *In vitro* models of the blood–brain barrier // *Methods Mol Biol.* 2022. P. 25–49. doi: 10.1007/978-1-0716-2289-6_2
2. Eremeev A., Belikova L., Ruchko E., et al. Brain organoid generation from induced pluripotent stem cells in home-made mini bioreactors // *J Vis Exp.* 2021. N 178. doi: 10.3791/62987
3. Pham M.T., Pollock K.M., Rose M.D., et al. Generation of human vascularized brain organoids // *Neuroreport.* 2018. Vol. 29, N 7. P. 588–593. doi: 10.1097/WNR.0000000000001014
4. Salmina A.B., Kharitonova E.V., Gorina Y.V., et al. Blood–brain barrier and neurovascular unit *in vitro* models for studying mitochondria-driven molecular mechanisms of neurodegeneration // *Int J Mol Sci.* 2021. Vol. 22, N 9. P. 4661. doi: 10.3390/ijms22094661

Писарева Е.В.¹, Власов М.Ю.^{1,2} ✉, Волова Л.Т.², Самойленко Ф.О.¹

Сорбционные свойства аллогенного минерального компонента кости

¹ ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Самара, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара, Россия

✉ mvlasov1@rambler.ru

Аннотация. Изучена кинетика адсорбции антибиотиков и альбумина на поверхности минерального костного компонента из губчатой и компактной костной ткани. Установлено, что адсорбция цефтриаксона и тетрациклина на минеральном компоненте из губчатой костной ткани выше, чем на полученном из компактной костной ткани.

Ключевые слова: минеральный компонент кости; цефтриаксон; тетрациклин; бычий сывороточный альбумин.

Pisareva E.V.¹, Vlasov M.Yu.^{1,2}, Volova L.T.², Samoilenko F.O.¹

Sorption properties of allogenic mineral-organic component of bone

¹ Samara National Research University, Samara, Russia

² Samara State Medical University, Samara, Russia

Abstract. The kinetics of antibiotics and albumin adsorption on the surface of the mineral bone component from spongy and compact bone tissue was studied. The adsorption of ceftriaxone and tetracycline on the mineral bone component from cancellous bone tissue is higher than on that obtained from compact bone tissue.

Keywords: hydroxyapatite; mineral-organic bone component; ceftriaxone; tetracycline.

Минеральный компонент кости (МКК) обладает высокими показателями биологической активности и биосовместимости. Материалы, полученные на основе МКК могут найти широкое применение в медицине как биоматериал для замены и восстановления костных структур, для адресной доставки лекарственных средств к органам-мишеням [1]. МКК, выделенный из костной ткани животных может применяться в качестве носителя лекарственных средств и для замещения костных дефектов, поскольку обладает низкой иммуногенностью. Целью исследования стало изучение сорбционных свойств аллогенного МКК, полученного из компактной и губчатой костной ткани. Метод получения аллогенного МКК запатентован и заключается в предварительной механической очистке кости, ее отмывке и деминерализации в соляной кислоте. Далее из профильтрованных растворов путем добавления гидроксида натрия осаждают минеральный компонент до значений pH 7,2–7,4, промывали дистиллированной водой и высушивали [2, 3]. Исследовались измельчённые образцы МКК, полученные по технологии из компактного и губчатого костных веществ козы домашней (*Capra hircus*). В качестве адсорбтива использовались цефтриаксона натрия трисесквигидрат, тетрациклина гидрохлорид и бычий сывороточный альбумин. Исследования проводили при различных концентрациях данных соединений. Концентрацию адсорбтивов определяли спектрофотометрически. Для высоких концентраций белка использовали биуретовый метод. Выявлено, что МКК, полученный из компактной кости козы обладает большими адсорбционными свойствами по сравнению с МКК из губчатой костной ткани. Минимальный показатель адсорбции был у МКК из компактной костной ткани для тетрациклина и цефтриаксона. Данные по кинетике адсорбции альбумина показали, что время достижения стационарного состояния составляет 4 и 8 часов для компактного и губчатого МКК соответственно. Дальнейшее увеличение

времени экспозиции до двух суток не приводило к существенному изменению равновесной концентрации адсорбируемых веществ. Для достижения стационарного состояния цефтриаксона МКК из губчатой кости требуется 2 часа, из компактной кости — на 1 час меньше. Было также установлено, что МКК из губчатой кости отличается по своим сорбционным свойствам от компактного. Эти различия предположительно связаны с особенностями стехиометрического соотношения кальция и фосфора в гидроксипатите, его взаимодействием с аморфным фосфатом кальция, наличием микроэлементов. Результаты исследования могут быть применены для решения задач практической медицины, для создания новых методов исправления дефектов костной ткани в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, при производстве лекарственных средств, в косметологии и в ветеринарии. Дальнейшие работы по созданию композитов на основе МКК и его модернизации могут значительно улучшить возможности по адсорбции биологически-активных соединений.

Список литературы

1. Mondal S., Park S., Choi J., et al. Hydroxyapatite: a journey from biomaterials to advanced functional materials // *Adv Colloid Interface Sci.* 2023. Vol. 321. ID 103013. doi: 10.1016/j.cis.2023.103013
2. Патент РФ № 2372892 / 20.11.2009. Волова Л.Т., Подковкин В.Г. Писарева Е.В., и др. Биоимплантат для восстановления структуры и объема костной ткани. EDN: ZHNYXJ
3. Патент РФ № 2704114 / 24.10.2019. Волова Л.Т., Писарева Е.В., Власов М.Ю., и др. Способ получения минерально-органического компонента костной ткани. EDN: BHSUAZ

Писарева Е.В.¹✉, Волова Л.Т.², Власов М.Ю.^{1,2}

Доклиническая оценка безопасности минерального компонента костной ткани *in vitro* и *in vivo*

¹ ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Самара, Россия

² ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет», Самара, Россия

✉ pisarevera@rambler.ru

Аннотация. Исследовано влияние минерального компонента костной ткани на фибробласты и обменные процессы при внутримышечном введении животным. Токсического действия на организм млекопитающих не выявлено. При моделировании остеорезорбции происходит стимулирование процессов коллагеногенеза.

Ключевые слова: минеральный компонент кости; фибробласты; гидроксиапатит; крысы Wistar; остеорезорбция.

Pisareva E.V.¹, Volova L.T.², Vlasov M.Yu.^{1,2}

Preclinical assay of bone mineral component *in vitro* and *in vivo*

¹ Samara National Research University, Samara, Russia

² Samara State Medical University, Samara, Russia

Abstract. The influence of the mineral component of bone tissue on fibroblasts and metabolic processes when administered intramuscularly to animals was studied. No toxic effects on the body of mammals have been identified. When modeling osteoresorption, stimulation of collagenogenesis processes was revealed.

Keywords: bone mineral component; fibroblasts; hydroxyapatite; Wistar rats; osteoresorption.

Поиск новых безопасных биосовместимых биоматериалов для профилактики остеорезорбции и лечения других патологий костной ткани в настоящее время является актуальным направлением практической медицины в области травматологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [1, 2]. Одним из таких материалов является минеральный компонент кости (МКК) аллогенного происхождения. МКК является материалом, получаемым из костной ткани животных и человека по запатентованной технологии. Имеет химическую формулу гидроксиапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, и в отличие от всех известных синтетических кальцийсодержащих материалов и синтетического гидроксиапатита содержит комплекс микроэлементов, которые входят в неорганический компонент костной ткани и может быть использован в качестве материала для замещения собственного костного вещества у пациентов. В связи с этим целью исследования стала оценка влияния МКК аллогенного происхождения на культуру фибробластов *in vitro* и организм животных *in vivo*. Внесение фрагмента МКК в культуру фибробластов приводило к постепенному повышению плотности монослоя клеток от центра (места внесения образца) к периферии, количество клеток в зонах 2 и 3 составило соответственно 88 ± 12 и 200 ± 31 клеток на $0,1 \text{ мм}^2$, при этом показатели в зоне 3 не отличались от контрольных значений. На следующем этапе проводили оценку безопасности применения суспензии МКК при внутримышечном введении крысам Wistar и кроликам породы Советская шиншилла. Установлено, что инъекции МКК в виде суспензии в мышечную ткань животных в дозах от 10, 40, 100, 200 мг/кг массы тела не приводили к существенным изменениям биохимических показателей в крови экспериментальных животных и состояния иммунокомпетентных органов. Эффективность применения МКК (остеопротективное действие) у животных при моделировании остеорезорбции исследовано в эксперименте на крысах и кроликах с применением различных патогенетических моделей остеорезорбции — глюкокортикоидной (при экзогенном введении и эндогенном повышении стероидов, модель периодической кратковременной интенсивной гипертермии),

гипоэстрогенной, модели антиортостатического вывешивания (опорная разгрузка задних конечностей) и сочетание опорной разгрузки с введением глюкокортикоидов. Инъекции аллогенного МКК интактным животным не вызывали патологических изменений со стороны жизненно важных органов животных, отложений кальцинатов в тканях, отклонений основных параметров гомеостаза от контрольных значений. При введении МКК на фоне остеорезорбции отмечалась нормализация уровня продуктов деградации коллагена, их приближению к контрольным показателям и увеличение синтеза пропептидов коллагена I типа. На последнем этапе исследовали влияние внутримышечных инъекций аллогенного МКК на крупных животных — свиньях породы Ливенская. Животные были разделены на две группы: экспериментальная (внутримышечные инъекции суспензии МКК) и контрольная (инъекции стерильного физиологического раствора в эквивалентном объеме). Экспериментальной группе делали две инъекции суспензии с интервалом 14 суток. Взятие венозной крови на общий и биохимический анализы осуществлялось в 1-й (перед введением препарата), 14-й и 28-й день после введения МКК. На 28-е сутки у выведенных из эксперимента животных делали забор фрагментов органов и тканей на гистологические исследования. При внутримышечном введении МКК опытным животным не выявлено существенных изменений большинства морфологических и биохимических показателей крови. В области инъекции препарата патоморфологические признаки поражения мышечной ткани отсутствовали. Признаки воспаления, а также поражения жизненно важных органов не выявлены. Отложений кальцинатов в тканях не обнаружено. Исходя из полученных данных можно предположить, что МКК не оказывает токсического действия на организм млекопитающих. Для обоснования применения нового биосовместимого МКК с целью профилактики и лечения остеорезорбции необходимо более детальное изучение механизмов его воздействия на регуляцию метаболических процессов и механизмов запуска регенерации костной ткани.

Список литературы

1. Avanzi I.R., Parisi J.R., Souza A., et al. 3D-printed hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering: A systematic review in experimental animal studies // *J. Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2023. Vol. 111, N 1. P. 203–219. doi: 10.1002/jbm.b.35134
2. Xiao X., Liu Z., Shu R., et al. Periodontal bone regeneration with a degradable thermoplastic HA/PLCL bone graft // *J Mater Chem B*. 2023. Vol. 11, N 4. P. 772–786. doi: 10.1039/d2tb02123d

Плешаков П.С.¹✉, Белоусова Д.А.¹, Филатов Н.А.¹, Букатин А.С.^{1,2}

Микролуночная платформа для изолирования и длительного культивирования одиночных клеточных сфероидов, сформированных методами капельной микрофлюидики

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет имени Ж.И. Алфёрова РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ avekip@gmail.com

Аннотация. Клеточные сфероиды являются перспективными моделями для тканевой инженерии и скрининга лекарств. Был разработан метод изолирования и наблюдения за одиночными сфероидами, используя капельную микрофлюидику. Наблюдения показали высокую жизнеспособность, что подтверждает эффективность метода.

Ключевые слова: сфероиды; микрофлюидика; двойная эмульсия; изолированное культивирование.

Pleshakov P.S.¹, Belousova D.A.¹, Filatov N.A.¹, Bukatin A.S.^{1,2}

Microwell platform for long-term cultivation of isolated cell spheroids formed by droplet microfluidics methods

¹ Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute for Analytical Instrumentation RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Cell spheroids are promising models for tissue engineering and drug screening. A method for isolating and monitoring single spheroids using droplet microfluidics was developed. The results showed high viability, confirming the effectiveness of the method.

Keywords: spheroids; microfluidics; double emulsion; isolated cultivation.

Трёхмерные клеточные культуры представляют собой высокий интерес для использования в качестве модели органа или ткани, поскольку, в отличие от двумерных культур, поведение клеток в них приближено к нативным тканям и органам. Клеточные сфероиды являются миниатюрными скоплениями клеток с плотными межклеточными контактами и перспективны для применения в тканевой инженерии и скрининге лекарственных средств. Существует множество способов формирования сфероидов [1], однако многие из них трудоёмки или плохо контролируемы. Одним из способов формирования повышения производительности синтеза клеточных сфероидов является использование технологий капельной микрофлюидики, с помощью которых происходит изолирование группы клеток в каплях одинарной или двойной эмульсии [2]. Однако при таком методе формирования остается проблема сложности наблюдения за конкретными сфероидами, поскольку, в отличие от двумерных культур, они зачастую не зафиксированы на дне, могут менять своё положение и быть утрачены при смене питательной среды. Таким образом, целью данной работы является разработка метода изолирования и длительного наблюдения за одиночными клеточными сфероидами, сформированными методами капельной микрофлюидики. В качестве клеток были использована линия аденокарциномы толстого кишечника мыши CT26 EGFP, экспрессирующая флуоресцентный белок в цитоплазму. Клетки инкубировали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и 1% v/v гентамицина при 37°C и 5% CO₂. Для формирования сфероидов была

использована микрофлюидная технология создания двойной эмульсии вода-масло-вода. Для этого использовалось микрофлюидное устройство с тремя входами для жидкостей и двумя генераторами эмульсии. Первый генератор формировал эмульсию «вода-в-масле», а следующий «масло-в-воде», получая на выходе эмульсию «вода-масло-вода». Поток центральной водной фазы состоял из питательной среды RPMI 1640 с FBS, Pluronic F127, уплотнителя среды Ficoll 400 и суспензии клеток СТ 26 EGFP. Поток масляной фазы состоял из фторуглеродного масла, содержащего 1% ПАВ FluoroSurf (Dolomite). Поток внешней водной фазы состоял из питательной среды RPMI 1640 с FBS и Pluronic F127. Клетки, находящиеся в внутри двойной эмульсии, формировали кластеры в течение 3-х часов инкубации, после чего масляную оболочку разрушали и освободившиеся кластеры помещали в микролунки диаметром 500 мкм и глубиной 250 мкм, сформированные в пленке из полидиметилсилоксана (ПДМС), закрепленной на дне чашки Петри. ПДМС пленка с микролунками была изготовлена методом мягкой литографии [3], по мастер форме, полученной с помощью SLA 3D-печати. Для создания неадгезивного покрытия поверхность микролунок обрабатывали раствором неионогенного ПАВ Pluronic F 127. Использование микролунок позволяло изолировать отдельные клеточные кластеры и наблюдать за их ростом в течение длительного времени. Клеточные кластеры культивировали в течение 11 дней, среду меняли каждые 2 дня. Для оценки жизнеспособности клеток использовали live/dead test. В качестве красителя мертвых и поврежденных клеток использовался йодистый пропидий. Живые клетки линии СТ26 EGFP флуоресцировали зеленым светом на длине волны 500–530 нм. Для оценки динамики роста сфероидов полученные на конфокальном микроскопе Zeiss AxioObserver Z1 Yokogawa Spinning Disk (Германия), изображения обрабатывали в программе с открытым исходным кодом ImageJ. Клеточные кластеры формировали сфероиды на 3-й день культивирования, что можно судить по более плотному прилеганию клеток друг к другу и образованию ровной сферической поверхности. С 4-го по 7-й день сфероиды увеличивались в диаметре в 2,3 раза достигая диаметра 250 мкм, что показывало высокую пролиферативную активность. На 7 день культивирования было замечено формирование некротического ядра из мёртвых клеток, характерного для сфероидов такого размера [4]. Таким образом, данный метод формирования и наблюдения сфероидов показал себя простым и удобным в использовании инструментом для исследований и имеет перспективу для применения в скрининге лекарств.

Работа поддержана грантом РФ № 20-74-10117.

Список литературы

1. Shao C., Chi J., Zhang H., et al. Development of cell spheroids by advanced technologies // *Advanced Materials Technologies*. 2020. Vol. 5, N 9. doi: 10.1002/admt.202000183
2. Chong D., Liu X., Ma H., et al. Advances in fabricating double-emulsion droplets and their biomedical applications // *Microfluid Nanofluid*. 2015. Vol. 19. P. 1071–1090. doi: 10.1007/s10404-015-1635-8
3. Kane R.S., Stroock A.D., Jeon N.L., et al. Soft lithography and microfluidics // *Optical Biosensors*. 2002. P. 571–595. doi: 10.1016/B978-044450974-1/50018-5
4. Kamatar A., Gunay G., Acar H. Natural and synthetic biomaterials for engineering multicellular tumor spheroids // *Polymers*. 2020. Vol. 12, N. 11. P. 2506. doi: 10.3390/polym12112506

Плешкова А.И.^{1,2} ✉, Пяткова М.А.^{1,2}, Надараиа К.В.¹, Машталяр Д.В.¹, Синебрюхов С.Л.¹, Гнеденков С.В.¹

Исследование остеогенеза и цитотоксичности бисфосфонат-содержащих покрытий

¹ Институт химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

✉ othariadna@gmail.com

Аннотация. Предложен способ внедрения бисфосфонатов в состав покрытия, формируемого методом плазменного электролитического оксидирования. Исследован остеогенез и цитотоксичность внедряемых веществ.

Ключевые слова: биоактивные покрытия; гибридные покрытия; плазменное электролитическое оксидирование; бисфосфонаты.

Pleshkova A.I.^{1,2}, Piatkova M.A.^{1,2}, Nadaraia K.V.¹, Mashtalyar D.V.¹, Sinebryukhov S.L.¹, Gnednikov S.V.¹

Study of osteogenesis and cytotoxicity of bisphosphonate-containing coatings

¹ Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract. A method for introduction of bisphosphonates into the composition of a coating formed by plasma electrolytic oxidation is proposed. Osteogenesis and cytotoxicity of the introduced substances are studied.

Keywords: bioactive coatings; hybrid coatings; plasma electrolytic oxidation; bisphosphonate.

В настоящее время остеопороз является гериатрическим заболеванием, связанным чаще всего с мено- и андропазузой у людей старше 50 лет [1, 2]. Однако остеопороз также может возникнуть как вторичное заболевание при лечении гипертериоза, заболеваний почек или при хирургическом удалении яичников. Кроме того, некоторые лекарственные средства увеличивают скорость потери костной массы за счет связывания с ионами кальция [3, 4]. Остеопороз — это системное заболевание скелета, для которого характерно снижение костной массы и нарушение микроархитектоники костной ткани. В связи с этим препараты бисфосфонатов (БФ) применяются для уменьшения будущих переломов костей у людей, у которых ранее были переломы вследствие остеопороза. В своей структуре БФ имеют метаболически стабильную структуру Р-С-Р, за счет которой возрастает химическая стабильность и устойчивость к ферментативной деградации, а также имеют высокое сродство к костным минералам. Основным механизмом действия БФ направлен на действие на клетки костной ткани — остеобласты и остеокласты. Бисфосфонаты индуцируют апоптоз за счет подавления мевалонового пути синтеза холестерина и пренилирования белков, тем самым нарушая структуру и функции остеокластов [5]. С другой стороны, за счет механизма их действия осуществляется стимуляция активности остеобластов. В настоящее время данный класс веществ все чаще используют при лечении злокачественных заболеваний костей, что связано с их эффективностью в ингибировании опухолевых клеток и подавлении метастазов в кости. В данной работе мы изучили способ внедрения бисфосфонатов трех поколений в состав кальций-фосфатных покрытий, полученных методом плазменного электролитического оксидирования (ПЭО). В качестве БФ первого, второго и третьего поколений были выбраны клодронат, аледронат и ризедронат соответственно. Остеогенез изучен на мезенхимальных стволовых клетках (МСК) после обработки их тремя поколениями БФ. Полученные данные свидетельствуют об усилении остеогенной

дифференцировки МСК в остеобласты с формированием кальциевых конгломератов. При этом плотность минерализации соединений кальция пропорциональна интенсивности окраски ализариновым красным при остеогенной дифференцировке МСК в сравнении с контролем, что при связывании бисфосфонатов с кальцием дает эффект усиления остеогенеза. Исследование цитотоксичности проводилось на культуре клеток остеосаркомы человека (MNNG/HOS). Согласно данным цитотоксического исследования можно сделать вывод что клодронат и аледронат не оказывают выраженного цитотоксического эффекта на клетки остеосаркомы человека (MNNG/HOS) в диапазоне концентраций 0,1–1000 мкМ. Морфологическое состояние клеток остеосаркомы при действии различных концентраций клодроната в сравнении с необработанными клетками остается неизменным. Однако при действии аледроната наблюдается изменения морфологического состояния клеток: ретракция отростков с ошариванием клеточных тел, что в отсутствие выявленного методом MTS цитотоксического эффекта может указывать на некоторое изменение их функционального состояния. Интересно, что ризедронат в диапазоне концентрация 0,01–10 мкМ усиливает интенсивность окраски реактивом MTS, что может быть следствием ускорения пролиферации клеток в этих лунках по сравнению с контролем. Тогда как при концентрации 1000 мкМ наблюдается выраженная цитотоксическая активность исследуемого соединения.

Список литературы

1. Salari N., Ghasemi H., Mohammadi L., et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: a comprehensive systematic review and meta-analysis // *J Orthop Surg Res*. 2021. Vol. 16, N 1. P. 609. doi: 10.1186/s13018-021-02772-0
2. Shanks G., Sharma D., Mishra V. Prevention and treatment of osteoporosis in women // *Obstet Gynaecol Reprod Med*. 2019. Vol. 29, N 7. P. 201–206. doi: 10.1016/j.ogrm.2019.04.001
3. Laurent M.R., Goemaere S., Verroken C., et al. Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis in adults: consensus recommendations from the belgian bone club // *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022. Vol. 13. ID 908727. doi: 10.3389/fendo.2022.908727
4. Lane N.E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: new insights into the pathophysiology and treatments // *Curr Osteoporos Rep*. 2019. Vol. 17, N 1. P. 1–7. doi: 10.1007/s11914-019-00498-x
5. Malwal S.R., O'Dowd B., Feng X., et al. Bisphosphonate-generated ATP-analogs inhibit cell signaling pathways // *J Am Chem Soc*. 2018. Vol. 140, N 24. P. 7568–7578. doi: 10.1021/jacs.8b02363

Плотникова Е.А.¹ ✉, Давлетшин Э.Ф.¹, Сабиров Д.Х.¹, Тимофеева А.В.¹, Агеева Т.В.¹, Мухамедшина Я.О.^{1,2}

Упражнения на беговой дорожке, дополненные терапией блокатора кальциевых каналов, стимулируют синтез нейропротекторных молекул через JAK-STAT3

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

✉ liza.plotnikova@gmail.com

Аннотация. В исследовании изучались эффекты сочетания тренировки на беговой дорожке с лечением габапентином при мягкой травме спинного мозга у крыс. Результаты показывают, что этот подход может усилить нейропротекторные процессы и поддержать функцию глиальных клеток через сигнальный путь JAK-STAT3.

Ключевые слова: травма спинного мозга; астроциты; нейрорегенерация; реабилитация; кальциевые каналы.

Plotnikova E.A.¹, Davletshin E.F.¹, Sabirov D.Kh.¹, Timofeeva A.V.¹, Ageeva T.V.¹, Mukhamedshina Ya.O.^{1,2}

Treadmill exercises combined with calcium channel blocker pharmacotherapy promote the production of neuroprotective molecules via the JAK-STAT3 signaling pathway

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract. The study investigated the effects of combining treadmill exercise with gabapentin treatment on mild spinal cord injury in rats. The results suggest that this approach may enhance neuroprotective processes and support glial cell function through the JAK-STAT3 signaling pathway.

Keywords: spinal cord injury; astrocytes; neuroregeneration; rehabilitation; calcium channels.

В рамках исследования было оценено влияние комбинированного подхода, включающего дозированную тренировку на беговой дорожке и применение блокатора субъединиц $\alpha 2$ - δ -потенциал-зависимых кальциевых каналов (габапентина), при мягкой контузионной травме спинного мозга крысы. Эксперимент был проведен на 20 лабораторных самках, которым фармакопрепарат вводился перорально через 1, 3, 12, 24 и 48 часов после нанесения травмы. Двигательная тренировка начиналась на 7-е сутки и длилась в течение трех недель.

Анализ иммунофлуоресцентного исследования двух популяций астроцитов в зоне вентральных рогов показал отсутствие значимых изменений в количестве ALDH1L1⁺/GFAP⁺-, ALDH1L1⁺/GFAP⁻-, S100A10⁺/GFAP⁻ и S100A10⁺/GFAP⁺ астроцитов в группе реабилитированных животных (ТСМ + ГБПН + ТМТ) по сравнению с травмированными (ТСМ + ГБПН) в условиях фармакотерапии габапентином. Кроме того, был проведен количественный анализ экспрессии генов *stat3*, *cntf* и *il-6rb* в области травмы (Th8) и на расстоянии 0,5 мм рострально и каудально от нее. В группе реабилитированных животных (ТСМ + ГБПН + ТМТ) на 28-е сутки после ТСМ было зафиксировано одновременное снижение уровня экспрессии гена *il6-rb* в 2,2 раза каудально от травмы, увеличение уровня экспрессии гена *cntf* в 2,43 раза рострально, а также снижение уровня экспрессии гена *stat3* в 1,58 раза ($p < 0,05$) по сравнению с травмированными (ТСМ + ГБПН) в условиях фармакотерапии габапентином.

Полученные данные могут свидетельствовать о положительных изменениях в сигнальных путях, которые способствуют нейропротекторной поляризации клеток глии, что улучшает их функциональное состояние и усиливает продукцию нейропротекторных и регенеративных молекул.

Плотников Е.Ю.^{1,2}✉, Абрамичева П.А.¹, Андрианова Н.В.¹, Буян М.И.^{1,3}, Зорова Л.Д.^{1,2},
Зоров Д.Б.^{1,2}, Певзнер И.Б.^{1,2}, Соколов И.А.¹

Участие стволовых клеток в повреждении и регенерации почки при старении и нефропатиях

¹ НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия

³ Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ plotnikov@belozersky.msu.ru

Аннотация. Исследование посвящено изучению возрастных и половых особенностей регенеративного потенциала почек. Проведён анализ количества и пролиферативной способности прогениторных клеток, а также изучено влияние обструкции мочеточника на их распределение. Эксперименты проводились на трансгенных мышцах с использованием нестина как маркера прогениторных клеток.

Ключевые слова: почка; регенерация; стволовые клетки; нефропатия; старение; нестин.

Plotnikov E.Yu.^{1,2}, Abramicheva P.A.¹, Andrianova N.V.¹, Buyan M.I.^{1,3}, Zonova L.D.^{1,2},
Zorov D.B.^{1,2}, Pevzner I.B.^{1,2}, Sokolov I.A.¹

The involvement of stem cells in kidney damage and regeneration during aging and nephropathies

¹ Belozersky Research Institute, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Kulakov center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology, Moscow, Russia,

³ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The study is dedicated to the investigation of the age and sex characteristics of the regenerative potential of the kidneys. The number and proliferative capacity of progenitor cells and the effect of ureteral obstruction on their distribution were analyzed. The experiments were carried out on transgenic mice using nestin as a marker for progenitor cells.

Keywords: kidney; regeneration; stem cells; nephropathy; aging; nestin.

Почка — орган с медленным обновлением клеток, но обладающий мощным механизмом регенерации. Сложность морфологии и функций почечной ткани и медленное обновление затрудняют изучение процессов восстановления клеток нефронов. В частности, нет единого мнения о клетках, ответственных за обновление эпителия нефронов и их регенерацию при повреждении. Основные гипотезы: дедифференцировка зрелого эпителия или наличие прогениторных клеток. Гипотеза о дедифференцировке основана на окрашивании ткани после повреждения, показывающем пролиферацию эпителия и морфологические изменения, а также экспрессию эмбриональных маркеров. Но имеются данные и о резидентных прогениторных клетках почки. Они определяются по ряду специфических маркеров и исследуются, в том числе, с помощью трансгенных животных. Особый интерес вызывает S3-сегмент проксимальных канальцев из-за выраженной пролиферации после повреждения. Дистальная часть S3-сегмента может быть нишей для прогениторных клеток. Кроме того, как возможная ниша стволовых клеток также рассматривается почечный сосочек. Изучение регенеративного потенциала почки важно для регенеративной медицины и разработки методов лечения почечных повреждений.

Целью данной работы было исследовать возрастные и половые особенности регенеративного потенциала почек, фокусируясь на изучении количества и пролиферативной способности резидентных прогениторных

клеток, а также на влиянии унилатеральной обструкции мочеточника на распределение, миграцию и экспрессию ключевых маркеров почечных клеток-предшественников. В качестве одного из возможных маркеров резидентных прогениторных клеток почки рассматривается белок промежуточных филаментов нестин. В связи с этим в данной работе были проведены эксперименты на молодых и старых трансгенных мышях, несущих репортерный ген GFP под промотором гена нестина, проанализировано изменение в процессе старения количества нестин-положительных клеток в почке *in vivo*, скорость их пролиферации *in vitro*, а также устойчивость к нефротоксическому действию цисплатина, ишемическому повреждению и унилатеральной обструкции мочеточника.

Было показано, что у старых трансгенных мышей значительно снижено общее количество нестин-GFP положительных клеток в интактной почке. Несмотря на уменьшение количества этих клеток, у старых мышей прогениторные клетки все равно выявлялись, в основном, в предполагаемых нишах прогениторных клеток почки, а именно в S3-сегменте и почечном сосочке. Эксперименты *in vitro* на первичных культурах эпителия почечных канальцев (ЭПК) выявили, что с возрастом происходит снижение пролиферативной активности клеток ЭПК, и вместе с этим значительно медленнее происходит накопление нестин-положительных клеток. Также были проведены исследования влияния повреждающих воздействий на пролиферацию и жизнеспособность культур ЭПК. Так, жизнеспособность культур ЭПК от молодых мышей была значительно выше после инкубации с цисплатином. Аналогичным образом, клетки ЭПК от молодых мышей значительно быстрее восстанавливались после кислородно-глюкозной депривации, моделирующей ишемию почки.

Исследование половых особенностей регенерации почки было проведено на самцах и самках трансгенных нестин-GFP мышей, подвергнутых обструкции мочеточника различной продолжительности. Общую экспрессию GFP и распределение нестин-положительных клеток оценивали на 3-й и 7-й день после перевязки мочеточника. Также были проведены визуализация *in vivo* и анализ пролиферации в режиме реального времени, а также изучены ключевые маркеры клеток-предшественников. Обструкция мочеточника стимулировала перераспределение нестин-положительных клеток. Мы наблюдали увеличение количества нестин-положительных клеток, расположенных в почечных канальцах, и перераспределение нестин-положительных клеток из почечного сосочка, что было более выражено в почках, полученных от самок мышей. Мы обнаружили постепенное повышение уровней мРНК маркеров клеток-предшественников *SOX9*, *VIM*, *CD44* в почках мышей обоих полов после обструкции мочеточника.

Таким образом, можно сделать вывод, что с возрастом происходит резкое уменьшение количества нестин-положительных резидентных прогениторных клеток почки, что может объяснять возрастное снижение регенеративной способности почечной ткани и наблюдаемое падение устойчивости к повреждающим воздействиям. Кроме того, мы впервые продемонстрировали особенности распределения нестин-положительных клеток или их возможную миграцию в поврежденные зоны при обструкции мочеточника и более высокий регенеративный потенциал почек самок мышей.

Подвысоцкая В.С.^{1,2} ✉, Григорьева Е.В.^{1,3}, Медведев С.П.^{1,3}, Закиян С.М.^{1,3}

Использование экзогенной сверхэкспрессии SOX6 для направленной дифференцировки пациент-специфичных ИПСК, несущих генетический вариант с.1087G>T (р. G363C) в гене LGR4, в дофаминергические нейроны

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», Новосибирск, Россия

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН», Новосибирск, Россия

✉ v.podvysotskaya@g.nsu.ru

Аннотация. Для улучшения протокола дифференцировки клеток в дофаминергические нейроны в работе предложен метод экзогенной экспрессии транскрипционного фактора SOX6. Это позволит получить релевантную модель для изучения генетического варианта в гене *LGR4*, потенциально связанного с болезнью Паркинсона.

Ключевые слова: дофаминергические нейроны; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; транскрипционный фактор SOX6; направленная дифференцировка; ген *LGR4*; болезнь Паркинсона.

Podvysotskaya V.S.^{1,2}, Grigor'eva E.V.^{1,3}, Medvedev S.P.^{1,3}, Zakian S.M.^{1,3}

Use of exogenous SOX6 overexpression to target differentiation of patient-specific iPSCs carrying the c.1087G>T (p. G363C) genetic variant in the LGR4 gene into dopaminergic neurons

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. To improve the protocol of cell differentiation into dopaminergic neurons, we propose a method of exogenous expression of the transcription factor SOX6. This will provide a relevant model for studying a genetic variant in the *LGR4* gene potentially associated with Parkinson's disease.

Keywords: dopaminergic neurons; induced pluripotent stem cells; transcription factor SOX6; directed differentiation; *LGR4* gene; Parkinson disease.

Создание клеточных моделей с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) — это широко используемый во всём мире метод исследования патологических проявлений заболеваний человека. Так как ИПСК являются аналогом эмбриональных стволовых клеток, их состояние плюрипотентности позволяет получать любые клетки организма путём направленной дифференцировки. Наиболее актуальным на сегодняшний день является моделирование клеток головного мозга при нейродегенеративных заболеваниях [3]. Данная работа посвящена созданию модели дофаминергических нейронов (ДА-нейронов) при болезни Паркинсона из пациент-специфичных ИПСК.

Несмотря на существование множества локусов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, особый интерес в данной работе представляет ген *LGR4*, связь которого с заболеванием не была доказана. Белок,

который кодирует этот ген, отвечает за функционирование WNT/ β -катенин сигнального пути. WNT путь, в свою очередь, участвует в дифференцировке ДА-нейронов на эмбриональной стадии развития [2]. Поэтому, мы предполагаем, что мутация с.1087G>T (p.Gly363Cys) в гене *LGR4* может быть причиной возникновения болезни Паркинсона с ранним началом. Для анализа вклада данного варианта в патогенез заболевания, необходимо получить клеточную модель ДА-нейронов из пациент-специфичных ИПСК.

Единственный недостаток дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в ДА-нейроны чёрной субстанции заключается в невозможности добиться 100% экспрессии их основного маркера — SOX6 согласно существующим протоколам дифференцировки. Для того, чтобы исправить этот недостаток мы дополнили протокол экзогенным введением SOX6 в дифференцирующиеся клетки, используя плазмидные и эписомные конструкции, кодирующие данный маркер. Экзогенная сверхэкспрессия транскрипционного фактора SOX6 позволит по принципу положительной обратной связи добиться эндогенной экспрессии, что приведёт к получению однородных по экспрессии SOX6 культур ДА-нейронов [4]. Таким образом, мы сможем получить релевантную модель для дальнейшего изучения генетического варианта с.1087G>T (p.Gly363Cys) в гене *LGR4*.

Мононуклеары периферической крови пациентов с ранним началом болезни Паркинсона с мутацией в гене *LGR4* были репрограммированы для возврата к плюрипотентному состоянию. Полученные линии ИПСК культивировали, а затем характеризовали на плюрипотентность [1]: способность к спонтанной дифференцировке, иммунофлуоресцентный анализ и ОТ-кПЦР на маркеры плюрипотентности, кариотипирование, окраска на щелочную фосфатазу. Затем линии ИПСК были запущены в направленную дифференцировку в ДА-нейроны. На стадии нейральных предшественников клетки были трансфицированы плазмидными и эписомными конструкциями, кодирующими SOX6 и зелёный флуоресцентный белок EGFP для визуализации. Далее проводился сортинг клеток по зелёному сигналу и оценка эффективности трансфекции. На терминальной стадии проводилось иммунофлуоресцентное окрашивание на выявление маркеров ДА-нейронов (TH, TUBB3/TUJ1, SOX6, OTX2).

Охарактеризовано 7 линий ИПСК от 2 пациентов. Тест на спонтанную дифференцировку, кПЦР и иммунофлуоресцентный анализ подтвердили статус плюрипотентности линий. Клетки имеют нормальный кариотип и морфологически соответствуют плюрипотентным. Иммунофлуоресцентная окраска подтвердила наличие ДА-нейронов в культуре клеток. Получена клеточная модель ДА-нейронов для изучения патогенности варианта с.1087G>T (p.Gly363Cys) в гене *LGR4* при болезни Паркинсона.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда научно-технологического развития Югры в рамках научного проекта № 2023-573-05.

Список литературы

1. Grigor'eva E.V., Kopytova A.E., Yarkova E.S., et al. Biochemical characteristics of iPSC-derived dopaminergic neurons from n370s gba variant carriers with and without Parkinson's disease // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 5. P. 4437. doi: 10.3390/ijms24054437
2. Marchetti B., Tirolo C., L'Episcopo F., et al. Parkinson's disease, aging and adult neurogenesis: wnt/ β -catenin signalling as the key to unlock the mystery of endogenous brain repair // *Aging Cell*. Vol. 19, N 3. ID e13101. doi: 10.1111/acer.13101
3. Yasuhara T., Kameda M., Sasaki T., et al. Cell therapy for Parkinson's disease // *Cell Transplantation*. Vol. 26, N 9. P. 1551–1559. doi: 10.1177/0963689717735411
4. Oosterveen T., Garçon P., Moles-Garcia E., et al. Pluripotent stem cell derived dopaminergic subpopulations model the selective neuron degeneration in Parkinson's disease // *Stem Cell Reports*. 2021. Vol. 16, N 11. P. 2718–2735. doi: 10.1016/j.stemcr.2021.09.014

Поденкова У.И.¹✉, Кригер Д.В.¹, Бахмет Е.И.¹, Потапенко Е.В.², Томилин А.Н.¹, Цимоха А.С.¹

Выход эмбриональных стволовых клеток мыши из состояния наивной плюрипотентности сопровождается активацией иммунопротеасом

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт эволюции, Хайфский университет, Хайфа, Израиль

✉ uliana.podenkova@gmail.com

Аннотация. В исследовании показана активация иммунопротеасом в эмбриональных стволовых клетках мыши на стадии формативной плюрипотентности.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; дифференцировка; плюрипотентность; иммунопротеасомы; убиквитин-протеасомная система.

Podenkova U.I.¹, Krieger D.V.¹, Bakhmet E.I.¹, Potapenko E.V.², Tomilin A.N.¹, Tsimokha A.S.¹

Exit of mouse embryonic stem cells from naive pluripotency is accompanied by activation of immunoproteasomes

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Evolution, University of Haifa, Haifa, Israel

Abstract. The study demonstrates activation of immunoproteasomes in mouse embryonic stem cells at the stage of formative pluripotency.

Keywords: embryonic stem cells; differentiation; pluripotency; immunoproteasome; ubiquitin-proteasome system.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) — это тип плюрипотентных клеток млекопитающих, поддерживаемых в культуре, которые получают из внутренней клеточной массы бластоцисты на ранней стадии развития эмбриона. Благодаря способности к самообновлению и дифференцировке в различные типы соматических клеток, ЭСК обладают огромным потенциалом для использования в различных областях биомедицины, особенно в регенеративной и клеточной терапии.

За последнее десятилетие наше представление о биологии ЭСК значительно расширилось. Установлено, что плюрипотентные клетки эпибласта до и после имплантации существенно различаются. В ходе этого события происходит переключение сигнальных путей, изменение экспрессии ключевых маркеров и эпигенетические перестройки. В результате этих изменений эпибласт созревает, а клетки эпибласта постепенно переходят от «наивного» к «праймированному» состоянию плюрипотентности.

Соответственно, в зависимости от стадий раннего развития в культуре выделяют несколько типов плюрипотентных клеток, среди которых наивные, эпибластоподобные клетки (ЭпиПК или формативные) и эпибластные стволовые клетки (ЭпиСК или праймированные). Для поддержания плюрипотентности, а также для подготовки клеток к дифференцировке, требуется интенсивная работа систем регуляции протеома. Одним из основных клеточных механизмов, отвечающих за регуляцию времени жизни белков, является убиквитин-протеасомная система (УПС).

Протеолитическим ядром УПС является мультиферментный комплекс — протеасома, содержащий три каталитически активные субъединицы. При воздействии медиаторов воспаления происходит замена этих субъединиц на индуцибельные; новообразованный комплекс называется иммунопротеасомой.

Иммунопротеасомы играют важную роль в иммунной системе, эффективно расщепляя белки на короткие пептиды для их презентации молекулами МНС-I.

Недавние исследования все чаще указывают на роль иммунопротеасом в процессах, не связанных с процессингом антигенов. Так, в ЭСК человека наблюдается повышенная экспрессия генов иммунопротеасом по сравнению с дифференцированными клетками [1], что предполагает их участие в поддержании плюрипотентности ЭСК. В свою очередь, в ЭСК мыши экспрессия иммунопротеасом отсутствует, однако, временно повышается на ранних стадиях дифференцировки [2]. Наблюдаемая разница в экспрессии иммунопротеасом между ЭСК человека и мыши может быть объяснена различиями в состояниях плюрипотентности этих клеток в культуре: праймированные ЭСК человека и наивные ЭСК мыши [3].

Для подтверждения данной гипотезы мы провели анализ уровней белков иммунопротеасом в ЭСК мыши на разных стадиях плюрипотентности: наивной, формативной (ЭпиПК) и праймированной (ЭпиСК) с помощью вестерн-блоттинга. Мы подтвердили отсутствие иммунопротеасом в наивных ЭСК мыши и синтез этих белков в ЭпиСК, что соответствует транскриптомным данным, доступным в открытых источниках [3]. Интересно, что мы также зафиксировали повышение уровня белков иммунопротеасом в ЭпиПК мыши. С помощью РНК-секвенирования мы выявили активацию экспрессии генов, кодирующих субъединицы иммунопротеасом, в ЭпиПК мыши.

Известно, что в сборке протеасом участвуют шапероны *Rac1-4* и *Pomr*. Поскольку скорость сборки иммунопротеасомы выше по сравнению с конститутивными протеасомами, но время их полужизни ниже, функциональная активация иммунопротеасом, по-видимому, должна сопровождаться увеличением экспрессии этих шаперонов. Действительно, мы обнаружили повышенные уровни мРНК шаперонов *Rac* и *Pomr* в процессе перехода ЭСК в состояние формативной плюрипотентности.

Таким образом, мы показали, что активация иммунопротеасом в ранней дифференцировке ЭСК мыши происходит уже на стадии формативной плюрипотентности. Важно отметить, что отличием ЭпиПК от ЭпиСК является их способность давать начало первичным зародышевым клеткам, что может указывать на роль иммунопротеасом в спецификации зародышевой линии.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-14-00390.

Список литературы

1. Atkinson S.P., Collin J., Irina N., et al. A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, N 7. P. 1373–1384. doi: 10.1002/stem.1113
2. Hernebring M., Fredriksson Å., Liljevald M., et al. Removal of damaged proteins during ES cell fate specification requires the proteasome activator PA28 // *Sci Rep*. 2013. Vol. 3. P. 1381. doi: 10.1038/srep01381
3. Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K., et al. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells // *Cell*. 2011. Vol. 146, N 4. P. 519–532. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.052

Поздняков Д.Ю. ✉, Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Влияние регулируемой кратковременной экспрессии факторов плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4 на свойства эндометриальных стромальных клеток человека

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ 9apdu179@gmail.com

Аннотация. На основе созданной лентивирусной системы индуцируемой экспрессии факторов плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4 получена и охарактеризована линия эндометриальных стромальных клеток.

Ключевые слова: клеточное старение; репрограммирование; факторы плюрипотентности; эндометрий; стромальные клетки.

Pozdnyakov D.Yu., Deryabin P.I., Borodkina A.V.

Effect of regulated short-term expression of pluripotency factors OCT4, SOX2, KLF4 on the properties of human endometrial stromal cells

Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Based on the constructed lentiviral system of inducible expression of pluripotency factors OCT4, SOX2, KLF4, a line of endometrial stromal cells was obtained and characterized.

Keywords: cellular senescence; reprogramming; pluripotency factors; endometrium; stromal cells.

Факторы плюрипотентности OCT4, SOX2, KLF4, cMYC (OSKM) успешно используют для репрограммирования различных типов клеток с целью получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. В последние годы кратковременная экспрессия данных факторов так же используется для так называемого частичного репрограммирования, которое не приводит к изменению специфичности клеток, но оказывается весьма эффективным для обращения их эпигенетического старения. Согласно нашим предварительным данным, эпигенетическое старение эндометриальных стромальных клеток (эСК) является одной из причин возраст-ассоциированного снижения репродуктивной способности женщин. Исходя из вышесказанного, мы предположили, что обращение эпигенетического старения эСК с помощью частичного репрограммирования может быть использовано для восстановления функциональных свойств этих клеток и в перспективе может послужить фундаментальной основой для новых стратегий улучшения женской фертильности. Таким образом, целью данной работы являлось создание системы для индуцибельной экспрессии факторов OCT4, SOX2, KLF4, получение на ее основе линии генетически-модифицированных эСК и оценка влияния кратковременной экспрессии факторов на свойства клеток.

Для экспрессии факторов OSK первичная линия эСК была модифицирована системой из двух лентивирусных векторов, полученных путем молекулярного клонирования. Один из них содержал кассету генов OCT4, SOX2, KLF4, разделенных 2a-последовательностями для полицистронной экспрессии, перед промотором которой содержалась регуляторная последовательность Tet-operator. Эта последовательность представляет собой сайт связывания белка-репрессора TetR, кодируемого вторым вектором. Такая система позволяла регулировать экспрессию факторов плюрипотентности добавлением в культуральную среду тетрациклина.

После индукции экспрессии факторов добавлением в среду тетрациклина, было выявлено значимое увеличение содержания транскриптов трансгенов в клетках, которое снижалось после удаления индуктора.

Было отмечено изменение пролиферативных свойств клеток в ответ на индукцию экспрессии факторов, а также морфологии эСК, которая восстанавливалась в отсутствии тетрациклина. Клеточная специфичность, которая оценивалась по экспрессии ряда специфичных генов, не изменялась при коротких сроках индукции, в отличии от клеток, с длительной обработкой тетрациклином.

Таким образом нами получена система временной экспрессии факторов OSK и охарактеризована линия эСК, полученная на ее основе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-10002).

Покровский Н.С. ✉, Водякова М.А., Мельникова Е.В.

Клеточная терапия: определение минимальных манипуляций

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, Москва, Россия

✉ pokrovsky.ns@gmail.com

Аннотация. В данной работе разъяснены термины «минимальные манипуляции», «гомологичное/негомологичное применение» согласно анализу регуляторных подходов России, ЕАЭС, ЕС и США.

Ключевые слова: клеточная терапия; высокотехнологичные лекарственные препараты; минимальные манипуляции; гомологичное применение; контроль качества; правовое регулирование.

Pokrovsky N.S., Vodyakova M.A., Melnikova E.V.

Cell therapy: definition of minimal manipulation

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract. In this work the terms “minimal manipulation”, “homologous/non-homologous use” based on the analysis of regulatory approaches of Russia, the EAEU, the EU and the USA are explained.

Keywords: cell therapy; advanced therapy medicinal products; minimal manipulation; homologous use; quality control; legal regulation.

В настоящее время в законодательстве ЕАЭС и России недостаточно четко разъяснены термины «минимальные манипуляции» и «гомологичное/негомологичное применение». Это может привести к применению у человека клеточных препаратов с недоказанной безопасностью и эффективностью.

Клеточные препараты могут быть классифицированы как трансплантаты или высокотехнологичные лекарственные препараты (ВТЛП) в зависимости от степени обработки клеток. Для ВТЛП в отличие от объектов трансплантации необходимы полный цикл исследований по разработке препарата, включая доклинические и клинические исследования, для доказательства безопасности и эффективности, а также государственная регистрация.

В США порядок определения принадлежности клеточного препарата на предмет минимальных или существенных манипуляций после обработки основан на определении структурной или неструктурной ткани и изменения биологических характеристик в результате манипуляций. Описание термина «гомологичное применение» основано на определении основной функции продукта — биологическом/физиологическом действии, которое он оказывает или способен оказать в нативном состоянии [1].

В ЕС и России (ЕАЭС) термины и перечень минимальных манипуляций гармонизированы [2, 3]. Перечень минимальных манипуляций содержит следующие процедуры: разрезание, измельчение, придание формы, центрифугирование, обработка растворами антибиотиков или антисептиков, стерилизация, облучение, разделение клеток, их концентрирование или очистка, фильтрование, лиофилизация, замораживание, криоконсервация, витрификация.

Препараты с минимальными манипуляциями и гомологичным применением во всех странах относятся к объектам трансплантации. Различие регуляторных подходов заключается в классификации препаратов, в процессе производства которых используется ферментативная обработка или селективный отбор клеток. Такие манипуляции в США относятся к существенным, а в ЕС и России (ЕАЭС) — к минимальным [4, 5]. Кроме того, в соответствии с национальным законодательством клетки в трансплантате могут содержать воду, кристаллоиды, стерилизующие, консервирующие и (или) пресервирующие агенты [5]. Однако в случае инкапсулирования или введения в состав препарата, содержащего минимально манипулированные клетки, матриц, скаффолдов, медицинских изделий, он будет классифицироваться как ВТЛП.

Таким образом, общим аспектом в толковании минимальных манипуляций регулирующими органами в мире является принцип сохранения биологических характеристик и физиологической функции продуктов после их проведения. Под гомологичным понимают применение тканей или клеток для выполнения или замещения присущих им функций в организме. Согласно законодательству США ферментативная обработка или селективный отбор клеток считаются существенными манипуляциями для ткани или клеток в отличие от нормативных документов ЕС и России.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 05600026-24-00 на проведение прикладных научных исследований (номер гос. учета НИР 124022200093-9).

Список литературы

1. Center for Biologics Evaluation and Research, Center for Devices and Radiological Health Guidance for industry and food and drug administration staff. regulatory considerations for human cells, tissues, and cellular and tissue-based products: minimal manipulation and homologous use. FDA, 2024. Режим доступа: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/regulatory-considerations-human-cells-tissues-and-cellular-and-tissue-based-products-minimal>. Дата обращения: 20.10.2024.
2. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Режим доступа: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_207379/. Дата обращения: 20.10.2024.
3. Regulation (EC) N 1394/2007 of the European Parliament and of the Council of 13 November 2007 on advanced therapy medicinal products and amending Directive 2001/83/EC and Regulation (EC) N 726/2004. Режим доступа: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX%3A32007R1394>. Дата обращения: 20.10.2024.
4. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage and distribution of human tissues and cells. Режим доступа: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32004L0023>. Дата обращения: 20.10.2024.
5. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российской академии наук от 04.06.2015 № 306н/3 «Об утверждении перечня объектов трансплантации». Режим доступа: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_181448/. Дата обращения: 20.10.2024.

Покусаева И.А.¹ ✉, Наместникова Д.Д.^{2,3}, Черкашова Э.А.^{2,3}, Губский И.Л.^{2,3}, Коваленко Д.Б.²,
Самойлова Е.М.³, Сухинич К.К.², Вахрушев И.В.¹, Чехонин В.П.², Ярыгин К.Н.¹

Сравнительная терапевтическая эффективность мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из разных источников, при внутриартериальной трансплантации в условиях экспериментального ишемического инсульта у крыс

¹ ФГБНУ Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 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

✉ pokusaeva.i@yandex.ru

Аннотация. Новым подходом к лечению ишемического инсульта (ИИ) является клеточная терапия с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК). В работе проведено сравнение терапевтических эффектов МСК из разных источников и оценка распределения клеток в головном мозге на модели экспериментального ИИ.

Ключевые слова: ишемический инсульт; клеточная терапия; мезенхимальные стволовые клетки; МСК плацентарные; МСК из пульпы зуба; внутриартериальная трансплантация.

Pokusaeva I.A.¹, Namestnikova D.D.^{2,3}, Cherkashova E.A.^{2,3}, Gubsky I.L.^{2,3}, Kovalenko D.B.²,
Samoilova E.M.³, Sukhinich K.K.², Vakhrushev I.V.¹, Chekhonin V.P.², Yarygin K.N.¹

Comparative therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells isolated from different sources after intra-arterial transplantation in experimental ischemic stroke in rats

¹ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Federal Center for Brain and Neurotechnologies, FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. A new approach to the treatment of ischemic stroke (IS) is the cell therapy with mesenchymal stem cells (MSCs). In the paper, the therapeutic effects of MSCs from different sources were compared and the distribution of cells in the brain were evaluated using an experimental IS model.

Ключевые слова: ischemic stroke; cell therapy; mesenchymal stem cells; placental MSCs; dental pulp MSCs; intraarterial transplantation.

Ишемический инсульт (ИИ) продолжает оставаться актуальной медико-биологической проблемой, требующей разработки инновационных стратегий терапии. Множество данных, полученных в ходе доклинических исследований, свидетельствуют о положительной терапевтической эффективности мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при экспериментальном ИИ у лабораторных животных. Однако неполная изученность механизмов действия МСК и отсутствие единого мнения о времени, способе введения, дозе и источнике получения клеток затрудняют переход клеточной терапии ИИ в клиническую практику и требуют дальнейшего проведения фундаментальных исследований.

В данной работе проведено сравнение терапевтической эффективности человеческих мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из плаценты и пульпы молочного зуба, и оценено распределение клеток

в головном мозге при внутриартериальной трансплантации в условиях экспериментального ишемического инсульта.

Объектами исследования были выбраны самцы крыс линии Вистар, которым в начале эксперимента выполняли эндоваскулярную окклюзию средней мозговой артерии в течение 90 минут, после чего животные были разделены на три группы. Животным из первой (контрольной) группы внутриартериально вводили физиологический раствор ($n = 22$). Крысам из второй (терапевтической) группы ($n = 20$) внутриартериально трансплантировали человеческие плацентарные МСК в дозе 5×10^5 клеток. Данную группу разделили на две части: в одной подгруппе крыс ($n = 10$) проводилась оценка терапевтических эффектов МСК; во второй подгруппе ($n = 10$) методом МРТ и иммуногистохимического анализа выполнялась оценка распределения МСК в головном мозге. Животным из третьей (терапевтической) группы ($n = 10$) осуществляли внутриартериальное введение МСК пульпы молочного зуба в дозе 5×10^5 клеток. Внутриартериальную трансплантацию МСК проводили в правую внутреннюю сонную артерию (ВСА) спустя 24 часа после моделирования экспериментального ИИ. В течение 14-дневного периода наблюдения у крыс оценивали выживаемость, выраженность неврологического дефицита и объем очага инфаркта головного мозга. У животных проводили сравнение полученных данных из двух групп с клеточной терапией между собой и с группой контроля. На определенных временных точках (1 час, 1 сутки, 3 суток и 1 неделя после введения клеток) оценивали распределение меченых МСК плаценты в головном мозге методом магнитно-резонансной томографии (МРТ), в том числе непосредственно в момент трансплантации в режиме реального времени. Данные подтверждали гистологическим исследованием.

В ходе работы было показано, что МСК, выделенные из плаценты и пульпы молочного зуба, обладали равноценным положительным терапевтическим потенциалом: улучшали выживаемость лабораторных крыс и ускоряли восстановление неврологических дисфункций по сравнению с контрольной группой, однако, не оказали влияния на уменьшение объема очага инфаркта головного мозга. По данным МРТ в режиме реального времени МСК плаценты, введенные в правую ВСА, в течение первых 5 минут обнаруживались в стволе мозга и периинфарктной области правого полушария, к 15-й минуте визуализировались в очаге инфаркта, где к 20-й минуте достигали максимального количества, а также обнаруживались в единичных количествах в левом полушарии. Проведенное гистологическое исследование показало, что МСК находились внутри церебральных сосудов и сохранялись в них до 72 часов, после чего не определялись в головном мозге.

Исходя из полученных данных, человеческие МСК, выделенные из плаценты и пульпы молочного зуба, оказывают равное положительное терапевтическое действие на течение экспериментального ИИ. После внутриартериальной трансплантации МСК плаценты в течение 20 минут достигают зоны очага инфаркта и периинфарктной области, где обнаруживаются внутри церебральных сосудов. Таким образом, внутриартериальная трансплантация МСК через 24 часа после моделирования экспериментального инфаркта головного мозга является перспективным и безопасным методом лечения ишемического инсульта в острейшем периоде (14 дней).

Полешко А.Г.¹ ✉, Подгайский В.Н.², Басалай В.М.², Квачева З.Б.¹, Пинчук С.В.¹,
Василевич И.Б.¹, Тишук О.И.¹, Мисюкевич А.Ю.¹

Опыт клинического применения коллагенового носителя при лечении дефектов костной ткани с использованием клеточных технологий

¹ ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси», Минск, Республика Беларусь

² Институт повышения квалификации и переподготовки кадров здравоохранения УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

✉ renovacio888@yandex.ru

Аннотация. В работе описаны результаты доклинических и клинических исследований эффективности использования иммобилизованных на коллагеновом носителе мезенхимальных стволовых клеток, обогащенных внеклеточными везикулами, при лечении дефектов костной ткани.

Ключевые слова: биомедицинский клеточный продукт; мезенхимальные стволовые клетки; внеклеточные везикулы; дефект костной ткани; репаративный остеогенез.

Poleshko A.G.¹, Podgaisky V.N.², Basalai V.M.², Kvacheva Z.B.¹, Pinchuk S.V.¹, Vasilevich I.B.¹,
Tishuk O.I.¹, Misyukevich A.Yu.¹

Experience of clinical application of collagen carrier in the treatment of bone tissue defects using cell technologies

¹ Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

² Institute for Advanced Training and Retraining of Healthcare Workers of the Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Abstract. The paper describes the results of pre-clinical and clinical trials of the effectiveness of using mesenchymal stem cells immobilized on a collagen carrier, enriched with extracellular vesicles, in the treatment of bone tissue defects.

Keywords: biomedical cell product; mesenchymal stem cells; extracellular vesicles; bone tissue defect; reparative osteogenesis.

В настоящее время в мировой клинической практике имеется опыт лечения различных по этиологии дефектов костной ткани с использованием клеточных технологий [1]. При этом наиболее часто применяемым типом клеток при терапии являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК) и их клеточные продукты, обладающие иммуномодулирующим, противовоспалительным и репаративным потенциалом [2]. Однако до сих пор остается актуальным подбор оптимального биосовместимого обладающего остеоиндуктивными и -кондуктивными свойствами носителя для иммобилизации и доставки клеток в место дефекта [3]. Целью данной работы было провести доклинические и клинические исследования эффективности использования МСК, обогащенных собственными внеклеточными везикулами (ВВ), иммобилизованных на коллагеновом носителе, при лечении дефектов костной ткани.

Доклинические исследования проводили на лабораторных беспородных крысах с моделью дефекта костной ткани с соблюдением принципов биоэтики. В качестве клеточного продукта использовали культивированные аллогенные МСК (CD34⁻CD45⁻CD29⁺CD44⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺) жировой ткани крысы, обогащенные ВВ (фенотип: CD9⁺CD63⁺CD81⁺), полученными из кондиционированной ростовой среды культивирования клеток. В качестве носителя для клеток использовали материал на основе костного коллагена «Остеопласт»

(ООО НПК «Витаформ», РФ) в виде мембраны. Показано, что применение клеточного продукта на основе МСК, обогащенных ВВ (соотношение 1×10^9 ВВ/ 1×10^6 клеток), иммобилизованных на коллагеновой мембране и введенных в зону костного дефекта у животных с соответствующей моделью, способствовало формированию к 8-й неделе *in vivo* костной ткани, приближенной по гистоструктуре к нативной, что явилось экспериментальным обоснованием к проведению клинических исследований. В клинических исследованиях (одобрены этическим комитетом лечебного учреждения) принимали участие пациенты (мужской пол; $n = 10$; возраст 20–60 лет; отсутствие острых/хронических, в т.ч. инфекционных, заболеваний, без онкологических заболеваний в анамнезе) с дефектами костной ткани кисти, с их информированного добровольного согласия. Для каждого пациента по стандартной методике получали персонифицированный биомедицинский клеточный продукт (БМКП) на основе аутологичных МСК жировой ткани (количество клеток в терапевтической дозе не менее 20×10^6 ; фенотип: CD34⁻CD45⁻CD29⁺CD44⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺; жизнеспособность не менее 85%; подтвержденная микробиологическая стерильность), обогащенных ВВ (количество в терапевтической дозе не менее 1×10^9 ; фенотип: CD9⁺CD63⁺CD81⁺), который перед операцией иммобилизовали на коллагеновый носитель и вносили в зону дефекта в соответствии с разработанной схемой введения БМКП. Эффективность лечения определяли через 6 месяцев после операции — проводили контрольную рентгенограмму. Выявлено, что на момент обследования пациентов в 80% случаев после лечения дефектов костной ткани с использованием БМКП, иммобилизованного на коллагеновый носитель, наблюдался положительный клинический ответ: формировалась пери- и эндостальная костная мозоль однородной плотности с признаками консолидации на фоне значимого улучшения функциональной активности поврежденной конечности. Полученные результаты позволяют сделать вывод о целесообразности использования в протоколе лечения дефектов костной ткани, в частности кисти, обогащенных ВВ МСК жировой ткани, иммобилизованных на коллагеновом носителе «Остеопласт».

Список литературы

1. Gómez-Barrena E., Padilla-Eguiluz N.G., García-Rey E., et al. Validation of a long bone fracture non-union healing score after treatment with mesenchymal stromal cells combined to biomaterials // *Injury*. 2020. Vol. 51, Suppl. 1. P. S55–S62. doi: 10.1016/j.injury.2020.02.030
2. Wang X., Wang Y., Gou W., et al. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review // *Int Orthop*. 2013. Vol. 37, N 12. P. 2491–2498. doi: 10.1007/s00264-013-2059-2
3. Корель А.В., Кузнецов С.Б. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019. № 4. С. 228–234. EDN: JCDJ TJ

Поликарпов Е.В.¹ ✉, Козин С.В.¹, Смолярчук Е.А.¹, Сологова С.С.¹, Еремеева К.В.¹,
Миронцев А.В.¹, Шишмаков М.А.^{2,3}, Бакаева З.В.^{2,4}

Разработка методики получения первичной культуры нейронов спирального ганглия с целью изучения регенеративных свойств нейритов и скрининга отопротективных свойств соединений

¹ ФГАОУ ВО «Первый МГМУ имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия

³ ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Калмыцкий государственный университет имени Б.Б. Городовикова», Элиста, Россия

✉ polikarpov_e_v@staff.sechenov.ru

Аннотация. В мире около 10% населения страдают тугоухостью. Большинство пациентов имеют преимущественно нейросенсорной форму данного заболевания, которая характеризуется потерей волосковых клеток и/или повреждением слухового нерва. Разработка методики культивирования нейронов спирального ганглия является перспективной и востребованной в области изучения проблем слуха, однако требует совершенствования существующих на сегодняшний день методик, чему посвящена наша работа.

Ключевые слова: нейроны спирального ганглия; нейросенсорная тугоухость; первичная культура клеток; отопротекция; глиальные клетки; глутаматная эксайтотоксичность.

Polikarpov E.V.¹, Kozin S.V.¹, Smolyarchuk E.A.¹, Sologova S.V.¹, Eremeeva K.V.¹,
Mirontsev A.V.¹, Shishmakov M.A.^{2,3}, Bakaeva Z.V.^{2,4}

Development of methods of obtaining a primary spiral ganglion neurons culture to study the regenerative ability of neurites and screening of otoprotective properties of compounds

¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

² National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁴ Kalmyk State University named after B.B. Gorodovikova, Elista, Russia

Abstract. In the world, about 10% of the population suffers from hearing loss. Most patients have a sensorineural form of this disease, which is characterized by the loss of hair cells and/or damage to the auditory nerve. The development of a method for culturing spiral ganglion neurons is promising and in demand in the field of studying hearing problems, however, it requires improvement of currently existing methods, which is the subject of our work.

Keywords: spiral ganglion neurons; SNHL; primary cell culture; otoprotection; glial cells; glutamate excitotoxicity.

В мире около 10% населения страдают тугоухостью. Большинство пациентов имеют преимущественно нейросенсорной форму данного заболевания, которая характеризуется потерей волосковых клеток и/или повреждением слухового нерва. Методика выделения и культивирования слуховых нейронов является трудоемким и чувствительным ко многим факторам процессом. Основной проблемой при культивировании нейронов спирального ганглия является низкое соотношение нейронального и ненейронального компонента в модииолусе. Сателлитная глия принимают участие в развитии и выживании нейронов спирального ганглия *in vivo* и *in vitro*, но ее беспрепятственное размножение в первичной культуре может вносить неконтролируемый ошибочный вклад в результаты исследования. По этой причине культивирование клеток модииоларной

ткани в различных работах ограничивается 2–5 днями [1]. Разработка методики включает в себя не только увеличение доли нейронального компонента в первичной культуре, но и создание условий, способствующих выживанию нейронов при длительном культивировании. Разработка методики культивирования нейронов спирального ганглия является перспективной и востребованной в области изучения проблем слуха, однако требует совершенствования существующих на сегодняшний день методик.

Целью данного исследования является разработка методики получения первичной культуры ткани модиолуса с преобладанием нейронального компонента для изучения регенеративных возможностей нейронов спирального ганглия, скрининга отопротекторных свойств различных соединений и поиска перспективных подходов для лечения нейросенсорной тугоухости.

Проводили препарирование височных костей мышей (P1-3) и извлечение модиолярной ткани в холодном растворе HBSS без Ca^{2+} и Mg^{2+} с добавлением пирувата натрия и HEPES (1M). Из двух улиток мыши получали по $2,0 \times 10^4$ – $2,5 \times 10^4$ клеток на улитку. Диссоциацию ткани осуществляли с помощью раствора коллагеназы 0,1% в растворе HBSS без Ca^{2+} и Mg^{2+} и 0,05% раствора папаина с последующим промыванием раствором HBSS с Ca^{2+} и Mg^{2+} с пируватом натрия и HEPES 1 M. Далее переносили и суспензировали в среде Neurobasal Medium с добавлением 2% B27, 1% GlutaMax, 5 мкМ цитозина β -D-арабинофуранозида (AraC), 1% пенициллина/стрептомицина. Концентрация суспензии составляла 5×10^5 клеток на 1 мл. После смены каждого из растворов проводили центрифугирование 600x g и отбирали надосадочную жидкость для последующего замены раствора. С целью снижения потери фрагментов ткани суспензирование проводилось в эпиндорфе объемом 1,5 мл. Далее, суспензию распределяли в пластиковые чашки, предварительно покрытые полиэтиленгликолем 1 мг/мл по $7,0 \times 10^4$ клеток на лунку 35 мм чашки Петри или 3×10^4 96-луночного планшета. Клетки инкубировали при температуре 37 °C, 5% CO_2 и влажности 100%. Замена 1/3 среды осуществлялась каждые 3 дня. Оценку морфологии нейронов и фенотипирование клеток проводили с помощью иммуноцитохимии с использованием антител к β 3-тубулину и белку GFAP. Для оценки жизнеспособности клетки окрашивали витальными красителями: Syto-13 (1 мкМ, ex/em 485/530 нм) и EthD-1 (2 мкМ, ex/em 565/610 нм). Функциональный потенциал определяли методом флуоресцентного микроскопирования по изменению концентрации свободного Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i в цитоплазме после добавления глутамата (10–1000 мкМ). Для этого в клетки загружали флуоресцентный краситель FuraFF.

Культивирование клеток модиолярной ткани в среде NBM с добавлением B27, 5 мкМ AraC позволило нам получить первичную культуру клеток с соотношением нейронального и ненейронального компонента 1:5 без снижения выживаемости нейронов до 7 дней. Выживаемость клеток по данным клеточного каунтера после изолирования ткани из височной кости и её диссоциации составила от 40 до 70%. Максимальное время культивирования составила 10 дней. Нейрональные клетки были β 3-тубулин (+), глиальные клетки — GFAP (+). В культуре преобладали биполярные нейроны (70%), мультиполярные (25%), униполярные (5%), длина отростков варьировала от 70–200 мкм. Размер сомы нейронов в продольном сечении составлял 13–17 мкм нейронов, в поперечном — 5–9 мкм. При отсутствии AraC в культуральной среде наблюдалось преобладание глии. Нейрональные клетки дозозависимо отвечали на воздействие глутамата (100–1000 мкМ) изменением [Ca^{2+}]_i.

Нами разработана методика получения и культивирования первичной культуры модиолярной ткани с преобладанием нейронов нормальной биполярной формы. Дана подробная морфологическая и физиологическая характеристика культуры слуховых нейронов, что позволяет использовать её для изучения регенеративных свойств нейронов спирального ганглия, скрининга отопротекторных свойств различных соединений и разработки новых терапевтических подходов для лечения нейросенсорной тугоухости.

Список литературы

1. Schwieger J., Esser K.H., Lenarz T., et al. Establishment of a long-term spiral ganglion neuron culture with reduced glial cell number: effects of AraC on cell composition and neurons // *J Neurosci Methods*. 2016. Vol. 268. P. 106–116. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.05.001

Полтавцева Р.А.^{1,2} ✉, Воденникова А.А.^{3,4}, Моисеева Е.В.⁴, Окара П.С.^{4,5}, Бобкова Н.В.⁶,
Чернышев В.С.^{1,2}, Свирщевская Е.В.^{1,2,4}

Эффективность интраназального введения малых внеклеточных везикул на ориентировочно-исследовательское поведение и резистентность к стрессу у мышей разного возраста

¹ Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва, Россия

⁴ Государственный научный центр Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Россия, Москва, Россия

⁵ Институт тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова МИРЭА, Москва, Россия

⁶ Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

✉ rimpol@mail.ru

Аннотация. Изучен эффект интраназального введения малых внеклеточных везикул (мВВ) на восстановление исследовательского поведения и устойчивости к стрессу у мышей BALB/c разного возраста. Введение мВВ не влияло на молодых и среднего возраста мышей и восстанавливало двигательную активность у старых мышей.

Ключевые слова: малые внеклеточные везикулы; экзосомы; нейродегенерация; тест «открытое поле»; интраназальное введение.

Poltavtseva R.A.^{1,2}, Vodennikova A.A.^{3,4}, Moiseeva E.V.⁴, Okara P.S.^{4,5}, Bobkova N.V.⁶,
Chernyshev V.S.^{1,2}, Svirshchevskaya E.V.^{1,2,4}

Effect of intranasal administration of small extracellular vesicles on exploratory behavior and stress resistance in mice of different ages

¹ Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

² National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ National Research Nuclear University “MEPhI”, Moscow, Russia

⁴ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

⁵ M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies MIREA, Moscow, Russia

⁶ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia

Abstract. Effect of intranasal administration of small extracellular vesicles (sEV) on the restoration of research behavior and resistance to stress in BALB/c mice of different ages has been studied. The administration of sEV had no effect on young and middle-aged mice and restored motor activity in old mice.

Keywords: small extracellular vesicles; exosomes; neurodegeneration; open field test; intranasal administration

Малые внеклеточные везикулы (мВВ) размером 100–150 нм продуцируются различными клетками и могут транспортироваться кровью и лимфой для доставки биологически активных молекул к клеткам отдаленных органов и тканей. Предположительно, мВВ играют важную роль в различных биологических функциях, включая регуляцию физиологических и патологических процессов при различных заболеваниях. Целью данной работы являлась оценка возможности предупреждения возрастной нейродегенерации с помощью

интраназального (и/н) введения мВВ мышам разного возраста. Ранее мы показали, что мВВ долго циркулируют в крови, не элиминируются клетками печени, проходят через ГЭБ и распределяются по головному мозгу мышей. мВВ выделяли из культуральной среды (супернатанта), полученной при культивировании клеток мышей и человека. Мышам в возрасте 3, 10 и 20 месяцев вводили и/н по 10^8 /мышь sEV мышей или человека в 10 мкл 5–6 дней в неделю в течение 50 дней, суммарная доза составила 4×10^9 /мышь, что соответствует количеству мВВ в ~1 мл культуральной жидкости. По окончании введения и через месяц покоя мышей взвешивали и проводили анализ ориентировочно-исследовательского поведения и устойчивость к стрессу в тесте открытого поля (OFT). При сравнении мышей разного возраста по показателям OFT показали, что количество пересекаемых секторов, стоек (исследовательское поведение) и заходов в центр светлого поля (устойчивость к стрессу) у мышей 3 и 10 месяцев не различалось, но с возрастом снижалось в 2,6 раз число поиска норок. У старых мышей все показатели были в 2.4 (поиск норок) до 5.4 (количество стоек) раз ниже по сравнению с молодыми мышами. Длительное введение мВВ не влияло на вес мышей и показатели в OFT у молодых и среднего возраста мышей и полностью компенсировало возрастное снижение показателей у старых мышей. Отношение параметров молодых к старым мышам составило от 0,5 (поиск норок) до 1 (количество пересекаемых секторов). Анализ тех же параметров через 1 мес после окончания введения мВВ показал частичное снижение протективного эффекта у старых мышей. Отношение показателей составило от 1,3 (сектора) до 2,8 (количество стоек). Полученные данные показали, что интраназальное введение мВВ не влияет на поведение молодых и среднего возраста мышей, оказывает стимулирующий эффект на старых мышей и требует постоянного введения для компенсации возрастных изменений в старом возрасте. Эффект наблюдали по всем изученным параметрам. Механизм действия мВВ на поведение мышей не известен и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-13-00035.

Полянская Г.Г. ✉

Деятельность Коллекции культур клеток позвоночных, созданной профессором Г.П. Пинаевым

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ gpolanskaya@gmail.com

Аннотация. Представлена информация о создании профессором Г.П. Пинаевым Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур (РККК). Наиболее подробно описана практическая и научная деятельность Коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (ИНЦ РАН), утвержденного Центральным банком РККК.

Ключевые слова: Всесоюзная (Российская) коллекция клеточных культур; коллекция культур клеток позвоночных; Институт цитологии РАН.

Polyanskaya G.G.

Activities of vertebrate cell cultures created by professor G.P. Pinaev

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The abstracts provide information about the creation by Professor G.P. Pinaev of the All-Union (Russian) Collection of Cell Cultures (RCCC). The practical and scientific activities of the Collection of Vertebrate Cell Cultures of the Institute of cytology of the Russian Academy of Sciences (INC RAS), approved by the Central Bank of the Russian Academy of Sciences, are described in the most detail.

Keywords: All-Union (Russian) collection of cell cultures; collection of vertebrate cell cultures; Institute of cytology RAS.

Состояние биологической науки в СССР в начале 70-х годов прошлого века, создало необходимость создания в стране Коллекции клеточных культур, включающей в себя клеточные линии человека, животных и растений. Было очевидно, что отечественные перспективные фундаментальные и прикладные исследования в области молекулярной и клеточной биологии, генетики, эмбриологии неразрывно связаны с широким использованием культур клеток разного происхождения. Клеточные культуры также необходимы для решения прикладных задач медицины.

Поддержание исходных клеточных свойств и контроль их состояния осуществляют Национальные коллекции разных стран, создание которых происходило, в основном, во второй половине XX века. Наиболее крупной коллекцией была и существует по настоящее время Американская Коллекция Типовых культур (ATCC).

В 1978-ом году на уровне Государственного комитета Совета Министров СССР по науке и техники и Президиума Академии наук СССР было принято решение о создании Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур путем организационного объединения уже имевшихся в отдельных институтах коллекций человека, животных и растений. Инициатором и основоположником создания Всесоюзной (Российской) коллекции клеточных культур (РККК) является профессор, заслуженный деятель науки РФ Георгий Петрович Пинаев (1929–2013), который до последних дней своей жизни был координатором деятельности РККК. Под его руководством был выпущен каталог клеточных линий РККК [1].

Коллекция культур клеток позвоночных Института цитологии РАН (КККП) была утверждена Центральным банком РККК. До 1995 года руководителем КККП была к.б.н. И.И. Фридлянская, которая вместе

с Г.П. Пинаевым заложила основной фундамент коллекции. Совместно с сотрудниками КККП, И.И. Фридлянской была начата разработка паспортов коллекционных клеточных линий согласно международным требованиям, что послужило основой для дальнейшего развития коллекции. С 1995 года по настоящее время коллекцией руководит д.б.н. Г.Г. Полянская. В фондах КККП содержится 155 клеточных линий человека и животных, а также 674 депонированных клеточных линии и гибридомы. В 2018 году был выпущен каталог клеточных линий КККП [2]. Принципы работы КККП следующие: 1. создание, поддержание и развитие фондов коллекции; 2. создание паспортов клеточных линий, согласно международным требованиям; 3. совершенствование методов работы с клеточными линиями на основе проведения исследований, посвященных изучению влияния условий культивирования на генетическую изменчивость клеточных линий; расширение и углубление фундаментальных исследований по биологии клетки в культуре; 4. проведение активной научно-информационной деятельности; 5. депонирование клеточных линий и гибридом в связи с процедурой патентования; 6. обеспечение образцами коллекционного клеточного материала учреждений РФ; 7. оказание научно-методической помощи сотрудникам по методам культивирования и анализа клеточных линий. Следует подчеркнуть, что существенная часть заявок (п.6) связана с проблемами регенеративной медицины.

Георгий Петрович считал, что основой Коллекции должны быть научные исследования, проводимые на разных клеточных линиях. В связи с этим в КККП активно проводятся разносторонние исследования, охватывающие 7 направлений: 1) получение и характеристика гибридом; 2) изучение влияния условий культивирования, криоконсервации и контаминации на кариотипическую изменчивость клеточных линий; 3) получение и характеристика новых линий эмбриональных стволовых клеток человека; 4) получение и характеристика новых линий мезенхимных стволовых клеток (МСК) человека; 5) сравнительная характеристика активности матриксных металлопротеиназ в процессе дифференцировок и репликативного старения (РС) разных МСК; 6. реорганизация цитоскелета в процессе РС МСК. 7. получение и характеристика иммортализованных клеточных линий, выделенных из МСК. По направлениям 4–7 работа ведется в настоящее время.

Список литературы

1. Каталог Российской коллекции клеточных культур / под ред. Г.П. Пинаева, Г.Г. Полянской. Санкт-Петербург; Омск: ОмГПУ, 1999. 429 с.
2. Полянская Г.Г., Мусорина А.С. Коллекция культур клеток позвоночных: создание, деятельность, каталог. Санкт-Петербург: Издательство Политехнического университета, 2018. 185 с. EDN: X0FGGT

Попик Е.А.¹ ✉, Спасельникова А.В.¹, Шарова Е.И.¹, Скородумова Л.О.¹, Канаева В.А.¹,
Лагарькова М.А.¹, Богомазова А.Н.^{1,2}, Лебедева О.С.^{1,2}

Экспрессия белков внеклеточного матрикса и десмосомы в ИПСК на ранних стадиях дифференцировки дофаминергических нейронов с заменой G2019S в LRRK2

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

✉ evapopik2@gmail.com

Аннотация. В данной работе были показаны изменения в экспрессии компонентов внеклеточного матрикса при дифференцировке ИПСК с аминокислотной заменой G2019S в LRRK2, ассоциированной с болезнью Паркинсона, в предшественники дофаминергических нейронов.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; ИПСК; CRISPR/Cas9; LRRK2; внеклеточный матрикс.

Popik E.A.¹, Spaselnikova A.V.¹, Sharova E.I.¹, Skorodumova L.O.¹, Kanaeva V.A.¹, Lagarkova M.A.¹,
Bogomazova A.N.^{1,2}, Lebedeva O.S.^{1,2}

Expression of extracellular matrix and desmosomal proteins in iPSCs with the G2019S mutation in LRRK2 at the early stages of differentiation into dopaminergic neurons

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. The study demonstrates changes in the expression of extracellular matrix proteins during the differentiation of iPSCs with the G2019S mutation in LRRK2, associated with Parkinson's disease, into precursors of dopaminergic neurons.

Keywords: Parkinson's disease; iPSCs; CRISPR/Cas9; LRRK2; extracellular matrix.

Болезнь Паркинсона (БП) — является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием. Мутация G2019S в гене *LRRK2*, кодирующем богатую лейциновыми повторами киназу 2 (*LRRK2*), приводит к аминокислотной замене G2019S и является наиболее частой причиной возникновения наследственной формы БП. Клеточные модели на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов позволяют изучать ранние стадии дифференцировки дофаминергических нейронов, активно применяются для моделирования БП, скрининга лекарственных препаратов и разработки клеточной терапии. Кроме того, они подходят для изучения белков внеклеточного матрикса (ВКМ), которые важны для формирования нервной ткани, поддержания гомеостатических процессов мозга, регуляции активности нейронов и синаптической пластичности, и дефицит которых может ускорять процесс нейродегенерации [1, 2]. На данный момент существует не так много исследований, освещающих роль ВКМ в патогенезе БП. Опубликованные работы по этой теме, основанные на применении омиксных технологий, показывают, что пациенты с БП имеют измененный состав ВКМ и белков клеточных контактов [3, 4]. Однако для расширения

нашего представления о патогенезе БП необходимо проведение не только протеомных и транскриптомных, но и функциональных исследований, направленных на выявление изменений в составе ВКМ пациентов с БП.

Целью нашей работы является изучение экспрессии белков внеклеточного матрикса и белков десмосомы в культурах нейрозпитателя и нейрональных предшественников, дифференцированных из изогенных линий ИПСК с различными аллельными состояниями гена *LRRK2* по мутации 6055G>A. Уровень мРНК исследуемых генов оценивали с помощью количественной ПЦР. Экспрессию белков оценивали с помощью Вестерн блоттинга и иммуноцитохимического окрашивания.

В результате работы были обнаружены различия в экспрессии белков ВКМ и десмосомы между клетками здоровых доноров и изогенными клетками с различными аллельными состояниями по мутации 6055G>A в *LRRK2* уже на стадии ИПСК. Также наблюдались изменения экспрессии исследуемых генов в процессе дифференцировки, что свидетельствует о ремоделировании матрикса во время развития дофаминергических нейронов и необходимости более глубокого изучения патологических изменений при наследственных формах БП на стадии эмбриогенеза. Изучение патогенеза БП на молекулярном уровне будет способствовать развитию регенеративной терапии данной патологии.

Работа выполнена при поддержке гранта № 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования.

Список литературы

1. Dityatev A., Schachner M. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nature reviews // Neuroscience*. 2003. Vol. 4. P. 456–468. doi: 10.1038/nrn1115
2. Cescon M., Chen P., Castagnaro S., et al. Lack of collagen VI promotes neurodegeneration by impairing autophagy and inducing apoptosis during aging // *Aging*. 2016. Vol. 8, N 5. P. 1083–1101. doi: 10.18632/aging.100924
3. Raghunathan R., Hogan J.D., Labadorf A., et al. A glycomics and proteomics study of aging and Parkinson's disease in human brain // *Sci Rep*. 2020. Vol. 10, N 1. ID 12804. doi: 10.1038/s41598-020-69480-3
4. Tripathi U., Rosh I., Ben Ezer R., et al. Upregulated ECM genes and increased synaptic activity in Parkinson's human DA neurons with PINK1/ PRKN mutations // *NPJ Parkinsons Dis*. 2024. Vol. 10, N 1. P. 103. doi: 10.1038/s41531-024-00715-0

Попов В.С. ✉

Проблемы использования трансгенных животных в исследованиях регенерации

Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ galiatus@gmail.com

Аннотация. В докладе рассматриваются причины получения невоспроизводимых результатов при работе с трансгенными животными — фенотипическая неэквивалентность разных случаев модификации одного и того же гена, появление офф-таргетов в процессе модификации и фенотипическое влияние генетического фона — модифицируемой линии.

Ключевые слова: трансгенные мыши; регенерация; фенотипирование.

Popov V.S.

Problems of using transgenic animals in regeneration studies

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The report examines the reasons for obtaining non-reproducible results when working with transgenic animals — phenotypic non-equivalence of different cases of modification of the same gene, off-targets and the phenotypic influence of background strain.

Keywords: transgenic mice; regeneration; phenotyping.

Развитие технологий редактирования генома существенно обогатило методологические возможности исследований в русле регенеративной медицины. Это в первую очередь классические исследования «loss-of-function» и «gain-of-function», подразумевающие возможность «выключить» или «включить» работу как генов, кодирующих белок, так и регуляторных последовательностей. Второе важное применение технологий редактирования генома — создание линий гуманизированных животных, несущих человеческий генетический материал, отдельные популяции человеческих клеток или даже человеческие органы. Наконец, технологии редактирования генома позволили создать репортерные линии животных, которые сегодня позволяют отслеживать родство и генеалогию как отдельных популяций, так и индивидуальных клеток *in vivo*.

Трансгенные модели применяются в исследованиях регенеративных процессов уже почти четыре десятка лет, и за это время накопились данные о фундаментальных проблемах, связанных с их использованием.

Во-первых, трансгенные модели — это в основном грызуны (как правило — мыши), отличие в физиологии которых от человека существенно ограничивает возможность трансляции. К примеру, использование трансгенных мышей для исследования процессов регенерации кожной раны имеют лишь ограниченную применимость, так как даже у интактных мышей без терапевтического воздействия кожные раны заживают достаточно эффективно и быстро. Другой пример — отсутствие хронического воспаления у мышей, нокаутных по основному гликопротеину кишечника муцину 2, которое, видимо, эффективно предотвращается за счет гиперплазии кишечных ворсинок.

Во-вторых, широко распространенное применение линий мышей с генетически модифицированными компонентами иммунного ответа, как правило сопровождающимся недостаточностью иммунитета, позволяет исследовать трансплантации человеческих клеток в живой организм, но не позволяет смоделировать взаимодействие этих клеток с иммунокомпетентным окружением. Результаты таких экспериментов, особенно в отношении туморогенности исследуемых клеток, не могут быть безоговорочно приняты в качестве доклинических испытаний.

В-третьих, наиболее проблемным мне представляется некритическое смешение результатов, полученных на разных мышиных моделях, несущих генетические модификации в одном и том же гене. Накопленные результаты позволяют нам сделать общее заключение о неэквивалентности таких моделей. Она возникает в силу следующих обстоятельств: а) различные изменения в одном и том же гене, даже если они в одинаковой степени предотвращают появление функционального продукта, могут иметь разные фенотипические проявления; б) при внесении изменений в геном возможно появление так называемых «офф-таргетов», ненамеренных изменений, которые как правило сложно детектируются, но могут иметь фенотипический эффект, в) существенное влияние на фенотип оказывает бэкграунд — особенности линий, которая подвергается генетической модификации.

Проблемы с использованием трансгенных животных, особенно мышей, позволяют говорить об ограниченной применимости их в исследованиях регенеративных процессов и о необходимости параллельного использования других моделей, в первую очередь — крупных животных.

Попов К.В. ✉, Тризна Ю.А., Дружиловская О.С., Ребриков Д.В.

Опыт проектирования экспериментальных производственных площадок для выпуска высокотехнологичных лекарственных препаратов

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени В.И. Кулакова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

✉ marti-yana@yandex.ru

Аннотация. Максимальная гибкость в одновременном выпуске нескольких экспериментальных лекарственных препаратов достигается при производстве в режиме кампаний в изолированных технологических модулях.

Ключевые слова: GMP; производственная кампания; экспериментальная производственная площадка.

Popov K.V., Trizna U.A., Druzhilovskaya O.S., Rebrikov D.V.

Experience in designing of experimental manufacturing facilities for advanced medicines

National Medical Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology named after Academician V.I. Kulakov of Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. Maximum flexibility in the simultaneous production of multiple experimental drugs is achieved with campaign production in isolated process modules.

Keywords: GMP; production campaign; experimental manufacturing facilities.

Два из созданных в рамках реализации федерального проекта «Медицинская наука для человека» научно-образовательных комплексов полного цикла (НОКПЦ) будут включать экспериментальные площадки для производства генотерапевтических лекарственных препаратов и препаратов на основе соматических клеток.

Экспериментальные площадки должны обеспечить производство лекарственных препаратов, разработанных коллективами НОКПЦ, для проведения доклинических и клинических исследований. Производство лекарственных препаратов в соответствии с действующим законодательством должно отвечать требованиям Надлежащей производственной практики (GMP) [1]. Основой проектирования фармацевтического производства служит технологический регламент производства лекарственного препарата. В процессе производства биотехнологических препаратов выделяют две большие стадии: upstream и downstream. Стадия upstream включает процессы культивирования и наращивания биомассы микроорганизмов или эукариотических клеток. Стадия downstream — процессы выделения, очистки и концентрировании конечного продукта. Каждая стадия характеризуется своим набором оборудования и навыками персонала, необходимыми для ее проведения. При проектировании эти стадии размещают в отдельных, полностью независимых зонах.

В нашем случае экспериментальные площадки проектировались для выпуска препаратов, находящихся на ранней стадии разработки или идей. Кроме неопределенности в отношении процессов производства каждого препарата в отдельности, требовалось учесть необходимость одновременного выпуска на площадке нескольких препаратов. Эти требования привели нас к проектированию производства на основе технологических модулей. Под технологическим модулем понимается набор помещений, обеспечивающих производство одного препарата без выделения отдельных помещений для стадий upstream и downstream.

В каждом таком модуле лекарственный препарат будет производиться в режиме кампании, то есть проведения всего технологического процесса, включающего подготовку помещений и оборудования, загрузку материалов, необходимых для производства препарата, собственно производство препарата и уборку помещений.

Здание разделено на несколько функциональных зон: производство клеточных и вирусных препаратов, производство плазмидной ДНК, отдел контроля качества, склад материалов и оборудования, биобанк клеточных культур и готовых препаратов, биобанк бактериальных культур. Оптимальным было бы размещение всех зон в одноэтажном здании. Однако оценка необходимой полезной площади зданиякратно превышала площадь свободного участка. С учетом площади участка оптимальное зонирование удалось получить в четырехэтажном здании. Один из этажей — технический — занимает вентиляционное оборудование. Кроме требований GMP, производство генотерапевтических лекарственных препаратов, препаратов на основе клеток, полученных от доноров, и культивирование бактерий должно выполнять санитарные правила и нормы [2]. Для этого доступ персонала в производственные зоны, блок контроля качества и биобанк организован через санитарные пропускники. Все отходы из этих зон деконтаминируют в проходных автоклавах.

После получения положительного заключения государственной экспертизы проектной документации и результатов инженерных изысканий была проведена квалификация проекта (DQ). Квалификация проекта выявила 31 несоответствие проектных решений правилам GMP. Критическое замечание относится к недостаточной электрической мощности выделенной для системы водоподготовки. Большая часть замечаний относится к недостаточной детализации описания систем контроля перепадов давления, мониторинга частиц и особенностей конструкции чистых помещений. Одно замечание касается пересечения потоков чистых материалов и отходов. Все замечания будут устранены на стадии разработки рабочей документации.

Приведенный опыт проектирования экспериментальных площадок может быть использован при проектировании подразделений для выпуска персонализированных биомедицинских клеточных продуктов и высокотехнологичных лекарственных препаратов непосредственно в медицинских организациях.

Работы поддержаны государственным заданием № 123020800103-6.

Список литературы

1. Решение Совета ЕЭК от 3 ноября 2016 года № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза».
2. Постановление главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28 января 2021 года № 4 «Об утверждении санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Посессор А.Д. ✉

Сравнительная характеристика десны после применения коллагеновых матриц и соединительнотканых трансплантатов в области дентальной имплантации

ФГБУ НМИЦ ЦНИИС и ЧЛХ Минздрава России, Москва, Россия

✉ posessorad@ya.ru

Аннотация. Дана характеристика структурных различий десны донорской зоны до и после применения коллагеновых матриц и свободных соединительнотканых трансплантатов в области дентальных имплантатов с помощью гистологического исследования.

Ключевые слова: коллагеновый матрикс; свободный соединительнотканый трансплантат (ССТ); морфометрия; иммуногистохимия.

Posessor A.D.

Comparative analysis of the effects of collagen matrices and connective tissue grafts on gum tissue after dental implant procedures

Federal State Institution “Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery”, Moscow, Russia

Abstract. The characterization of structural differences between the gum tissues of the donor area and after the use of collagen matrices and free connective tissue grafts for dental implant procedures, using morphological and immunohistochemical methods.

Keywords: collagen matrix; tissue graft; morphometry; immunohistochemistry.

Врачи-стоматологи используют соединительнотканые ауотрансплантаты, полученные из области бугра верхней челюсти и твёрдого нёба, для увеличения объёма мягких тканей вокруг дентальных имплантатов, а также в качестве их замены используют материалы на основе коллагеновых матриц, среди которых наибольшее распространение получили Fibro-Gide и FibroMatrix [1]. Результаты применения материалов и ауотрансплантатов отличаются по наиболее важным клиническим параметрам: объём и цвет десны [2]. Однако данных о влиянии тканевого и клеточного состава на эти клинические параметры ещё не представлено.

Целью исследования было выявить структурные различия десны в области применения коллагеновых матриц и соединительнотканых трансплантатов в зоне дентальной имплантации с помощью гистологического исследования и морфометрии.

На первом этапе лечения были установлены дентальные имплантаты и в область дефицита мягких тканей помещены так называемые стоматологами свободные соединительнотканые трансплантаты (ССТ), полученные из области нёба или бугра (неиспользуемые части оценивали гистологически), и коллагеновые матрицы Fibro-Gide и FibroMatrix. Через 3 месяца, на втором этапе дентальной имплантации, перед установкой формирователя десны получали биопсии с регенератом, которые передавали на гистологическое исследование. Срезы толщиной 5–10 мкм, изготовленные из парафиновых блоков, окрашивали красителями: гематоксилином и эозином, по Ван Гизону, по Массону и пикросириусом красным (Biovitrum, Россия). Дополнительно была проведена иммуногистохимическая окраска антителами к белкам CD68, CD45, Vimentin и Ki67 для оценки остаточного воспаления в тканях после имплантации коллагеновых матриц и ССТ.

Далее получали гистотопограммы срезов, которые фотографировали, после чего измеряли относительную площадь сосудов, соединительной и жировой ткани, остатков исследуемых коллагеновых матриксов и фибробластов, макрофагов, лейко- и лимфоцитов с помощью программы Adobe Photoshop v21 (США) и ImageJ v.2 по описанной методике [3]. Статистически значимые различия были выявлены при уровне статистической значимости 5% ($\alpha = 0,05$) после использования однофакторного дисперсионного анализа и апостериорного теста Тьюки в GraphPad Prism v10.

В ССТ до применения относительный объём жировой ткани и площадь сосудов были статистически значимо больше в области твёрдого нёба и составили соответственно $(9,8 \pm 4,8)\%$ и $(2,3 \pm 0,6)\%$, против соответственно $(7,2 \pm 1,1)\%$ и $(1,2 \pm 0,6)\%$ в области бугра верхней челюсти. Количество фибробластов было больше в трансплантатах с бугра — (6321 ± 1032) клеток в мм^2 , по сравнению с трансплантатами с нёба — (5094 ± 913) клеток в мм^2 .

Спустя 3 месяца после использования ССТ и их заменителей в виде коллагеновых материалов, наибольшее относительное количество соединительной ткани было выявлено в группе с применением ССТ с бугра — $(68,8 \pm 2,3)\%$. Относительное количество соединительной ткани после использования ССТ из области нёба от коллагенового материала Fibro-Gide не отличалось. Наименьшее количество соединительной ткани было выявлено при использовании материала FibroMatrix — $(50,1 \pm 1,7)\%$.

Наибольшая площадь сосудов была выявлена в группах с применением ССТ с нёба — $(2,7 \pm 0,2)\%$ и материала Fibro-Gide — $(2,2 \pm 0,2)\%$. Наименьшая площадь была выявлена при использовании ССТ с бугра — $(1,1 \pm 0,2)\%$ и материала FibroMatrix — $(1,0 \pm 0,1)\%$.

В результате подсчета количества клеток, статистически значимые различия были между группой ССТ с нёба — (5008 ± 339) клеток в мм^2 и коллагеновыми матриксами — (3766 ± 269) и (3597 ± 337) клеток в мм^2 для двух групп соответственно. После применения коллагеновых матриксов к 3-му месяцу еще сохранялись макрофаги, лейкоциты и лимфоциты, что было связано с резорбцией остатков коллагеновых матриксов, которые наблюдали в регенератах.

Таким образом, исходная структура регенерата десны сохраняет морфологические свойства исходного трансплантата. Так, в ССТ из области нёба и в регенерате, полученном после его применения, площадь сосудов и количество фибробластов более высокие по сравнению с бугром. Коллагеновые матриксы к 3-му месяцу после использования резорбируются не полностью и провоцируют макрофагальную, лейко- и лимфоцитарную инфильтрацию при снижении относительного количества фибробластов в регенерате. Также после использования коллагеновых матриксов следует ожидать меньший относительный объём соединительной ткани и сосудов, чем при использовании ССТ. Полученные данные гистологического исследования позволяют объяснить различия в клинических результатах применения коллагеновых матриксов и ССТ с нёба и бугра.

Список литературы

1. Zucchelli G., Tavelli L., McGuire M.K., et al. Autogenous soft tissue grafting for periodontal and peri-implant plastic surgical reconstruction // J Periodontol. 2020. Vol. 91, N 1. P. 9–16. doi: 10.1002/JPER.19-0350
2. Cosyn J., Eeckhout C., Christiaens V., et al. A multi-centre randomized controlled trial comparing connective tissue graft with collagen matrix to increase soft tissue thickness at the buccal aspect of single implants: 3-month results // J Clin Periodontol. Vol. 48, N 12. P. 1502–1515. doi: 10.1111/jcpe.13560
3. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B., et al. Osteoinductive potential of highly porous polylactide granules and bio-oss impregnated with low doses of BMP-2. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Krasnoyarsk: Institute of Physics and IOP Publishing Limited, 2020. doi: 10.1088/1755-1315/421/5/052035

Посыпанова Г.А.¹ ✉, Осипов А.А.², Жирник А.С.¹, Шапошникова Д.А.¹, Кириченко С.В.¹

Радиочувствительность нейральных стволовых клеток

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

² ФИЦ ХФ РАН им. Н.Н. Семенова, Москва, Россия

✉ galinapo@gmail.com

Аннотация. Культура нейральных стволовых клеток является удобной моделью для исследования эффектов, вызываемых ионизирующим излучением. Показана экстремально высокая чувствительность НСК нейтронному излучению. Нарушение пролиферации, обусловленное повреждением ДНК, сопровождалось нарушением нейрогенеза.

Ключевые слова: нейральные стволовые клетки; ионизирующее излучение; нейтроны; γ H2AX; дифференцировка.

Posypanova G.A.¹, Osipov A.A.², Zhirnik A.S.¹, Semochkina Yu.P.¹, Kirichenko S.V.¹

Radiosensitivity of neural stem cells

¹ NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² N.N. Semenov FRC Chemical Physics, Moscow, Russia

Abstract. The culture of neural stem cells is a convenient model for studying the effects caused by ionizing radiation. Extremely high sensitivity of NSC to neutron radiation has been demonstrated. The disruption of proliferation caused by DNA damage was accompanied by disruption of neurogenesis.

Keywords: neural stem cells; ionizing radiation; neutrons; γ H2AX; differentiation.

Одной из основных причин развития когнитивной дисфункции после облучения опухолей головного мозга является гибель или нарушение функций нейральных стволовых клеток (НСК). НСК — это очень маленькая популяция мультипотентных клеток головного мозга, локализованная у млекопитающих после рождения и в течение всей жизни, главным образом, в 2 нейрогенных нишах: зубчатой извилине гиппокампа и субвентрикулярной зоне боковых желудочков. НСК отличаются способностью к самообновлению в течение всей жизни, а также дают начало коммитированным прогениторным клеткам, которые далее дифференцируются в нейроны, астроциты, олигодендроциты и замещают погибшие или поврежденные клетки. *In vitro*, в оптимальных условиях культивирования, НСК способны пролиферировать в течение многих пассажей без изменения свойств [1], и являются удобной моделью для исследований разного типа, в том числе для изучения радиочувствительности НСК.

Опасность действия ионизирующего излучения в умеренных дозах (0.1–2 Гр) заключается, в первую очередь, в его способности вызывать различные типы повреждений ДНК. Повреждение ДНК активирует сложный клеточный ответ, включающий остановку клеточного цикла, транскрипционную и посттранскрипционную активацию множества генов, включая гены, контролирующие целостность ДНК, а в случае значительных повреждений — развитие запрограммированной гибели клеток. Двунитевые разрывы (ДР) составляют относительно небольшую часть всех радиационно-индуцированных повреждений ДНК, однако именно они являются наиболее опасными. Нарушение на любом из этапов репарации ДР ДНК может приводить к гибели клеток или возникновению мутаций.

НСК мыши выделяли из цельного головного мозга неонатальных мышей и культивировали в виде нейросфер в бессывороточной среде с добавлением факторов роста и добавки В-27. Культуру характеризовали на ранних и поздних пассажах по наличию маркеров стволовых/прогениторных клеток

и дифференцированных клеток. Окончательную характеристику клеток (определение доли НСК и 7 популяций прогениторных клеток, НПК) проводили по методу Буоно [2] с использованием антител к CD133, LeX, NG2 и CD140a. Доля НСК составляла $70 \pm 10\%$ от всех клеток в культуре, остальные клетки были представлены популяцией MP1 — мультипотентные предшественники, способные к самообновлению и трипотентной дифференцировке.

Культивируемые НСК на 18–30 пассажах облучали в коллимированном пучке нейтронов и гамма-квантов ядерного реактора ИР-8 (γ, n -излучение) в диапазоне доз 0.025–2 Гр. Облучение НСК в дозах свыше 100 мГр приводило к подавлению пролиферации, снижению клоногенной активности, радиационно-индуцированному старению и гибели облученных клеток. γ, n -Излучение индуцировало образование значительного количества ДР ДНК, регистрируемых по появлению фокусов гистона $\gamma H2AX$ в ядрах клеток. Репарация ДР проходила медленно и сопровождалась остановкой клеточного цикла в фазах G2/M. Остановка в G2/M предотвращает вступление клеток с поврежденной ДНК в митоз и, в свою очередь, предотвращает аномальную сегрегацию хромосом. Клетки с блоком в G2/M могут перейти к следующей фазе клеточного цикла, если репарация ДНК прошла без ошибок, в противном случае клетки погибают путем апоптоза и аутофагии. Скорость и эффективность репарации ДР ДНК, а также размеры фокусов $\gamma H2AX$ зависели от дозы γ, n -излучения. Гибель облученных клеток, преимущественно, проходила по механизму апоптоза. Облучение в дозах свыше 0.5 Гр также приводило к развитию аутофагии у 19–28% (в зависимости от дозы) облученных НСК.

Исследование влияния γ, n -излучения в диапазоне доз 0.25–1 Гр на дифференцировку НСК, индуцированную удалением из культуральной среды факторов роста, выявило нарушение нейрональной дифференцировки облученных клеток с одновременным усилением астроглиальной дифференцировки. Эта же тенденция сохранялась у клеток, выживших после облучения (дифференцировку индуцировали через 96 ч после облучения).

Таким образом, мы показали, что культивируемые НСК чрезвычайно чувствительны к нейтронному излучению. Наряду с ингибированием пролиферации, индукцией апоптоза и аутофагии нарушается нейрогенез. Возможно, это является следствием изменения субпопуляционного состава культуры НСК после облучения нейтронами.

Список литературы

1. Foroni C., Galli R., Cipelletti B., et al. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells *ex vivo* // *Cancer Research*. 2007. Vol. 67, N 8. P. 3725–3733. doi: 10.1158/0008-5472.can-06-4577
2. Buono K.D., Goodus M.T., Moore L., et al. Chapter 15 — Multimarker flow cytometric characterization, isolation and differentiation of neural stem cells and progenitors of the normal and injured mouse subventricular zone. In: Pruszek J., editor. *Neural surface antigens*. Elsevier, 2015. P. 175–186. doi: 10.1016/B978-0-12-800781-5.00015-3

Пресняков Е.В.^{1,2} ✉, Копылов Е.Д.², Далгатов М.Г.¹, Емелин А.М.¹, Бозо И.Я.², Деев Р.В.^{1,2}

Генная активация регенерации костной и соединительной тканей

¹ «НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына» ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

² АО «Гистографт», Москва, Россия

✉ uvpres@gmail.com

Аннотация. В работе представлены результаты влияния ген-активированного и ксеногенного остеопластических материалов на репаративный остеогенез в сравнительном аспекте. Установлено, что регенерация костной ткани протекает наиболее эффективно при использовании ген-активированного изделия «Гистографт».

Ключевые слова: костная пластика; репаративный остеогенез; ген-активированный остеопластический материал; материал-ассоциированная костная резорбция.

Presnyakov E.V.^{1,2}, Kopylov E.D.², Dalgatov M.G.¹, Emelin A.M.¹, Bozo I.Ya.², Deev R.V.^{1,2}

Gene activation of bone and connective tissue regeneration

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal state budgetary scientific institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Ministry of Science and Higher Education of Russia, Moscow, Russia

² Histograft JSC, Moscow, Russia

Abstract. The work presents the results of the influence of gene-activated and xenogeneic osteoplastic materials on reparative osteogenesis in a comparative perspective. It has been established that bone tissue regeneration occurs most effectively when using the gene-activated product “Histograft”.

Keywords: bone grafting; reparative osteogenesis; gene-activated osteoplastic material; material-associated bone resorption.

Остеопластические материалы высоко востребованы в клинической практике. Челюстно-лицевая хирургия, травматология и ортопедия, ЛОР-хирургия, нейрохирургия — все эти направления тесно связаны с реконструктивными операциями опорно-двигательного аппарата, что обуславливает разработку и внедрение в клиническую практику широкого спектра костнозамещающих изделий.

Аутотрансплантаты до сих пор считаются золотым стандартом для аугментации костной ткани, поскольку не содержат ксеногенных белков, не требуют специальной очистки и включают в себя остеоиндукторы, способствующие репаративному остеогенезу [1]. Однако использование аутогенного материала тесно связано с известными ограничениями — дополнительной хирургической процедурой резекции с возможными осложнениями донорской области (включая боль, кровопотерю, гематому, инфекционный процесс) и увеличением времени операции. Кроме того, при использовании костной крошки необходимы барьерные мембраны для исключения прорастания в них мягких тканей, а также использование титановой сетки, обеспечивающей поддержание заданной формы для направленной регенерации кости [2]. Вышеперечисленные недостатки ограничивают использование аутологичной кости и определяют необходимость разработки новых материалов, способных вытеснить аутотрансплантаты из клинической практики. Одним из таких материалов является «Гистографт» — первый в мире ген-активированный остеопластический материал, разрешенный для клинического применения. С момента регистрации в качестве медицинского изделия на территории РФ в 2019 году проведено более 3000 костнопластических операций с применением «Гистогракта» в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, а возможность получения трепанобиоптатов из зон костной пластики при двухэтапных протоколах имплантологического лечения позволило детализировать эффект «Гистогракта» на формирование костной ткани на гистологическом уровне.

Цель исследования — сравнить влияние ксеногенного и ген-активированного остеопластических материалов на репаративный остеогенез при костной пластике челюстей.

Исследование было проведено на 40 биоптатах костного регенерата, полученных от пациентов в момент формирования ложа для дентального имплантата через 6 месяцев после проведения костной пластики в области верхней и нижней челюстей с использованием материалов «Bio-Oss» (Geistlich, Швейцария, $n = 15$) и «Гистографт» («Гистографт», Россия, $n = 15$). После завершения операции костные биоптаты фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина и проводили микрофокусную компьютерную томографию. Анализ полученных результатов осуществлялся с помощью программного обеспечения для объёмной визуализации CTvox (Bruker, США).

Для гистологического исследования микропрепараты изготавливали по стандартной методике, включающей этап декальцинации, которую проводили в растворе «Софтидек» (Бiovитрум, Россия) при соотношении объема объекта и объема декальцинирующей жидкости 1:50 в течение 12 часов. Гистологическую проводку, заливку, и микротомию с получением срезов толщиной 3–5 мкм осуществляли по стандартной методике. Препараты окрашивали обзорными красителями (гематоксилином и эозином), по Маллори, по Массону-Голднеру, осуществляли импрегнацию нитратом серебра, проводили иммуногистохимическое исследование (ИГХ) с антителами к карбоангидразе II (CA2) (Origene, США) для визуализации резорбирующих материал клеток и CD31 (Novus Bio, Великобритания) для обнаружения кровеносных сосудов. Затем, с помощью инструментов программного обеспечения Adobe Photoshop (Adobe, США), в ходе морфометрического анализа, выделяли области, занятые ретикулофиброзной костной тканью, пластинчатой костной тканью, волокнистой соединительной тканью, остеопластическим материалом, с последующим подсчётом процентного соотношения компонентов костного регенерата.

По результатам микрофокусной компьютерной томографии микрогранулы как ксеногенного матрикса, так и ген-активированного материала определялись во всем объеме регенерата и были окружены вновь образованной костной тканью.

По результатам гистологического исследования ни один из костнозамещающих материалов не спровоцировал воспалительную реакцию, что подтвердило их биосовместимость.

При исследовании биоптатов с ксеногенным матриксом регенерат состоял преимущественно из пластинчатой костной ткани, плотно прилегающей к поверхности гранул остеопластического материала, что обусловлено проявлением изделием остеокондуктивных свойств. Единичные фрагменты материала были окружены пучками коллагеновых волокон, формирующими будущий костный каркас. Однако прорастание коллагеновых волокон непосредственно в структуру матрикса не было обнаружено. Единичные клетки, резорбирующие фрагменты костнозамещающего материала, свидетельствовали о крайне низкой скорости его резорбции.

При исследовании биоптатов с ген-активированным остеопластическим материалом «Гистографт» регенерат характеризовался мультитканевым строением: трабекулы костной ткани формировали единую балочную систему, фрагменты матрикса располагались межтрабекулярно и интратрабекулярно, в ряде полей зрения были окружены богато васкуляризованной рыхлой волокнистой соединительной тканью. Остеоид был сформирован непосредственно на поверхности фрагментов костнозамещающего изделия, что, вероятно, вызвано остеоиндуктивным эффектом. При иммуногистохимическом исследовании с антителами к CA2 на поверхности микрогранул было выявлено обилие многоядерных клеток, предположительно остеокластов, резорбирующих материал.

По результатам гистоморфометрического исследования доля вновь образованной костной ткани в группе с использованием Гистографта составила 10,86%, что статистически значимо больше (t -критерий, $p = 0,039$), чем в группе с использованием материала «Bio-Oss» — 4,32%. Разница между средними значениями групп обладает большой величиной эффекта и составляет 1,09 стандартного отклонения. При сравнении количества кровеносных сосудов статистически значимые различия не были выявлены.

Таким образом, как материал «Bio-Oss», так и изделие «Гистографт» обеспечили формирование плотного костного регенерата, что обусловлено свойством остеокондукции. Вместе с тем ген-активированный материал «Гистографт», вероятно, за счет свойства остеоиндукции, обеспечил формирование наибольшего

объема костной ткани, что подтверждает его эффективность в качестве оптимального остеопластического трансплантата.

Список литературы

1. Lakshmiganthan M., Gokulanathan S., Shanmugasundaram N., et al. Piezosurgical osteotomy for harvesting intraoral block bone graft // J Pharm Bioallied Sci. 2012. Vol. 4, Suppl. 2. P. S165–S168. doi: 10.4103/0975-7406.100260
2. Amini A.R., Laurencin C.T., Nukavarapu S.P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges // Crit Rev Biomed Eng. 2012. Vol. 40, N 5. P. 363–408. doi: 10.1615/critrevbiomedeng.v40.i5.10

Примакова Е.А. ✉, Сыманович А.А., Назарова Е.А., Юркина Е.Г., Смольникова В.В.,
Романова И.А., Дедюля Н.И., Кривенко С.И.

Интерферон-гамма как потенциальный индуктор иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стромальных клеток

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

✉ gane_sel@mail.ru

Аннотация. Исследование способов повышения иммуномодулирующих свойств биомедицинских клеточных продуктов на основе МСК необходимо для усиления клинического эффекта. Полагают, что праймирование (предварительная обработка) МСК провоспалительными факторами позволит повысить эффективность клеточной терапии [1].

Ключевые слова: мезенхимальные стромальные клетки; интерферон-гамма; праймирование; усиление иммуномодулирующих свойств.

Primakova E.A., Symanovich A.A., Nazarova E.A., Yurkina E.G., Smolnikova V.V.,
Romanova I.A., Dedyulya N.I., Krivenko S.I.

Interferon-gamma as a potential inducer of immunomodulating properties of mesenchymal stromal cells

Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

Abstract. The study of ways to increase the immunomodulatory properties of biomedical cell products based on MSCs is necessary to enhance the clinical effect. It is believed that priming (preprocessing) MSCs with proinflammatory factors will increase the effectiveness of cell therapy [1].

Keywords: mesenchymal stromal cells; interferon-gamma; priming; enhancing of immunomodulating properties.

Объект исследования — мезенхимальные стромальные клетки (МСК) пупочного канатика (ПК), нативные и праймированные интерфероном-гамма (IFN- γ).

Цель — оценить воздействие режимов праймирования МСК ПК с помощью IFN- γ на уровень пролиферации, жизнеспособность и иммунофенотип МСК *in vitro*; сравнить воздействие нативных и праймированных МСК на пролиферацию Т-лимфоцитов.

МСК высевали в планшеты в концентрации 5000/см². По достижении клетками 70% конфлюэнтности в культуры добавляли IFN- γ (Gibco, UK) в 2 концентрациях — 200 нг/мл и 500 нг/мл на 24 часа. Контролем служили культуры без добавления IFN- γ . Далее определяли количество клеток, их жизнеспособность и иммунофенотип. Жизнеспособность и иммунофенотип исследовали методом проточной цитометрии с использованием набора Annexin V-FITC-7-AAD Kit и панели моноклональных антител CD105 PE, CD90 FITC, CD73 PE, CD29 PE, HLA-DR FITC (Beckman Coulter). Для постановки совместных культур лимфоциты здоровых доноров в количестве 500×10^3 добавляли на лунку 24-луночного планшета на подложку из праймированных IFN- γ или нативных МСК ПК (конфлюэнтность 70%) и инкубировали в течение 4 суток. Анализ пролиферации Т-лимфоцитов проводили на проточном цитометре. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью Microsoft Excel. Числовые значения представляли в виде медианы [минимум; максимум].

В результате исследования было установлено, что наибольшее количество клеток — 365×10^3 [185×10^3 ; 680×10^3] получали при культивировании с IFN- γ в концентрации 200 нг/мл ($n = 7$) по сравнению

с 500 нг/мл ($n = 7$) — 345×10^3 [145×10^3 ; 910×10^3], и контролем ($n = 7$) — 260×10^3 [$162,5 \times 10^3$; 844×10^3]. Данный факт может свидетельствовать о том, что высокие дозы IFN- γ снижают пролиферацию МСК ПК.

Добавление в культуру МСК ПК IFN- γ существенно не влияло на жизнеспособность клеток. В контрольных образцах ($n = 7$) процент 7-AAD-позитивных клеток — 1,8% [0,27; 3,90] даже превышал таковой в образцах, праймированных IFN- γ , — 0,97% [0,43; 3,8] для 200 нг/мл ($n = 7$) и 1% [0,27; 4,5] для 500 нг/мл IFN- γ ($n = 7$).

Экспрессия стромально-ассоциированных маркеров CD90, CD105, CD73, CD29 в культурах праймированных МСК не отличалась от нативных и составляла 100% во всех образцах ($n = 21$). Однако экспрессия HLA-DR значительно отличалась на праймированных клетках — 38,7% [11,3; 66,7] для концентрации IFN- γ 200 нг/мл ($n = 7$) и 42,1% [11,3; 69,4] для концентрации 500 нг/мл ($n = 7$) по отношению к контролю ($n = 7$) — 0% [0; 0,2]. Увеличение экспрессии HLA-DR на поверхности МСК в ответ на провоспалительные сигналы (IFN- γ) является одним из возможных механизмов усиления иммуномодулирующих свойств данных клеток.

Для оценки обратимости экспрессии HLA-DR клетки после удаления IFN- γ трипсинизировали и культивировали 4–9 дней. К 7-му дню экспрессия HLA-DR на праймированных МСК составляла для концентрации IFN- γ 200 нг/мл ($n = 4$) — 0,97% [0,36; 7,6], для концентрации 500 нг/мл ($n = 4$) — 0,81% [0,3; 3,6].

Со-культивирование праймированных IFN- γ в концентрации 200 нг/мл МСК с аллогенными лимфоцитами здоровых доноров ($n = 4$), предварительно окрашенных флуоресцентным клеточным линкером РКН26 (Sigma-Aldrich, США), показало снижение пролиферации лимфоцитов на праймированных клетках по сравнению с нативными МСК от 1,5 до 5 раз.

На основании полученных данных можно заключить, что праймирование МСК ПК IFN- γ в концентрации 200 нг/мл является предпочтительным с точки зрения поддержания их пролиферативной активности и не оказывает существенного влияния на их жизнеспособность по сравнению с нативными МСК. Праймирование МСК IFN- γ усиливает экспрессию HLA-DR на их поверхности (имеет частично обратимый характер) и способствует подавлению пролиферации аллогенных лимфоцитов.

Таким образом, IFN- γ в концентрации до 500 нг/мл может быть использован в качестве праймирующего агента для усиления иммуномодулирующих свойств МСК.

Список литературы

1. Dunn C.M., Kameishi S., Grainger D.W., et al. Strategies to address mesenchymal stem-stromal cell heterogeneity in immunomodulatory profiles to improve cell-based therapies // *Acta Biomater.* 2021. Vol. 133. P. 114–125. doi: 10.1016/j.actbio.2021.03.069

Приходько Е.М.^{1,2}, Юркевич Ю.В.¹, Енукашвили Н.И.^{1,3} ✉, Супильникова Н.В.^{1,3}, Багаева В.В.^{1,3}, Семенова Н.Ю.⁴, Крышень К.Л.⁵, Тараскин А.О.⁵, Бородина А.Ю.⁵

Препарат на основе дермальных фибробластов для поверхностного нанесения: экспериментальная оценка биобезопасности

¹ Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра пропедевтики внутренних болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, Россия

⁵ АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», пос. Кузьмолловский, Ленинградская область, Россия

✉ n.enukashily@incras.ru

Аннотация. Цель исследования: оценка биораспределения и туморогенности гелевой формы препарата на основе фибробластов, предназначенного для ускорения эпителизации ожоговых ран. Показано, что клетки остаются в составе геля после нанесения на рану или подкожно и не мигрируют в отдаленные от места нанесения участки. При оценке туморогенности согласно рекомендациям ОФС 1.7.2.0011.15 и проекта ОФС ЕАЭС у исследуемого препарата туморогенный потенциал выявлен не был.

Ключевые слова: дермальные фибробласты; ожоговая рана; туморогенность; биораспределение; наночастицы оксида железа; магнитно-резонансная томография.

Prikhodko E.M.^{1,2}, Yurkevich Yu.V.¹, Enukashvily N.I.^{1,3}, Supilnikova O.V.^{1,3}, Bagaeva V.V.^{1,3}, Semenova N.Yu.⁴, Kryshen K.L.⁵, Taraskin A.O.⁵, Borodina A.Yu.⁵

Dermal fibroblast-derived product for surface application: experimental evaluation of the biosafety of the product

¹ Cell Technologies Center “Pokrovsky”, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Medicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

⁴ Russian Scientific Research Institute of Hematology and Transfusiology FMBA of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

⁵ RMC “OME OF PHARMACY” JSC, Kuzmolovsky, Leningrad region, Russia

Abstract. Aim: To evaluate the biodistribution and tumorigenicity of the gel form of a fibroblast-based preparation designed to accelerate the epithelialization of burn wounds. The cells were shown to remain in the gel after application to the wound or subcutaneously and did not migrate to areas distant from the application site. When evaluating tumorigenicity according to the recommendations of the National Pharmacopoeia 1.7.2.0011.15 and the draft of the EAEU Pharmacopoeia, no tumorigenic potential was detected in the studied preparation.

Keywords: dermal fibroblasts; burn wound; tumorigenicity; biodistribution; iron oxide nanoparticles; magnetic resonance imaging.

Использование клеток различного происхождения в составе высокотехнологических лекарственных препаратов (ВТЛП) или биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) требует внесения изменений в стандартный протокол оценки безопасности, применяемый для лекарственных препаратов. Так, для таких препаратов не проводится оценка фармакокинетики. Однако необходимой является оценка

т.н. «биораспределения» — миграции, пролиферации и времени жизни клеток в организме реципиента. Кроме этого, особое внимание уделяется оценке туморогенности, т.е. способности клеток в составе ВТЛП подвергаться онкогенной трансформации и давать начало развитию опухоли. Тщательное исследование биораспределения и туморогенности ВТЛП и БМК позволяет минимизировать риски при их применении. Нами разработан препарат дермальных фибробластов на гелевой основе для ускорения эпителизации ожоговых (IIIa) и длительно незаживающих ран. Проведены исследования по оценке специфической активности и исследованию механизма действия препарата. Цель работы: оценка биораспределения и туморогенности гелевой формы препарата на основе фибробластов, предназначенного для ускорения эпителизации ожоговых ран. Для оценки миграции клеток из зоны нанесения фибробласты свиньи и крысы метили непокрытыми наночастицами оксида железа и использовали для изготовления исследуемого препарата. Полученный гель подкожно инъецировали соответственно свиньям и крысам. На 2, 4 и 6-е сутки животное сканировали с помощью магнитно-резонансного сканера 1.5T и анализировали положение затемненного участка в месте инъекции. Затем участок инъекции вырезали и использовали для приготовления гистологических срезов, которые окрашивали либо гематоксилин-эозином, либо по Перлсу. При анализе МРТ-изображений и гистологических срезов клеток за пределами места инъекции выявлено не было. Для оценки миграции клеток после нанесения их в составе геля на ожоговую рану крысы, крысам-самкам через сутки после нанесения ожога проводили некрэктомию в области раны, еще через три дня наносили на рану гель, содержащий фибробласты крыс-самцов. Через пять дней повязку с препаратом удаляли, на третий день после снятия повязки область раны фиксировали, заливали в парафин и использовали для приготовления гистологических срезов. Полученные срезы анализировали методом флуоресцентной гибридизации *in situ*, используя в качестве зонда фрагмент последовательности Y-хромосомы. При анализе изображений флуоресцентные сигналы за пределами раны обнаружены не были. Таким образом, миграция фибробластов за пределы раны выявлена не была.

Для оценки туморогенного потенциала фибробластов, используемых для приготовления геля, фибробласты человека вводили подкожно в объеме 200 мкл в правую тазовую конечность самкам мышей линии Nu/J, однократно, в дозах 10^6 и 10^7 клеток на животное. В качестве положительного контроля использовали клетки линии NT-1080, полученные из фибросаркомы в дозе 10^6 клеток на мышшь. Данные клетки схожи по происхождению с клетками в составе геля. Половину животных каждой группы наблюдали 21 дней, остальные животные были под наблюдением в течение 12 недель после инъекции. Ежедневно проводили оценку общего состояния животных и наличия у них пальпируемых образований в месте инъекции, два раза в неделю проводили измерение линейных размеров новообразований. В группе положительного контроля у всех животных на протяжении трех недель наблюдали прогрессирующий рост опухолевого узла в месте инъекции клеток NT-1080. В группах животных, получавших фибробласты человека, наличия и роста опухолевых образований не наблюдали. Гистологический анализ тканей в месте введения фибробластов, регионарных лимфатических узлов, легких, почек, печени, селезенки и головного мозга не выявил признаков туморогенности и очагов метастазирования.

Результаты исследования свидетельствуют об отсутствии миграции дермальных фибробластов из области нанесения. Данных, подтверждающих наличие туморогенного потенциала у дермальных фибробластов человека, получено не было.

Приходько Е.М.^{1,2}, Супильникова О.В.^{1,3} ✉, Масленникова И.И.^{1,3}, Енукашвили Н.И.^{1,3},
Котова А.В.^{1,3}, Багаева В.В.^{1,3}, Золина Т.Л.¹, Конкина А.И.¹, Яцемирский Г.С.¹

Создание банка клеточных культур: опыт Центра клеточных технологий «Покровский»

¹ ООО «Покровский банк стволовых клеток». Санкт-Петербург, Россия

² Кафедра пропедевтики внутренних болезней Медицинского института ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

✉ supilnikova@pokrovcell.ru

Аннотация. В соответствии с существующей нормативно-правовой базой в Центре клеточных технологий «Покровский» создан банк клеточных культур, соответствующих требованиям для изготовления ВТЛП и БМКП, а также для научных исследований. В докладе рассмотрены вопросы организации контроля качества, паспортизации, хранения образцов.

Ключевые слова: биобанк; биоресурсная коллекция; клеточные культуры; контроль качества клеточных культур; паспортизация клеточных культур; мезенхимные стромальные клетки; стволовые клетки пульпы зуба; клетки эндотелия пупочной вены.

Prikhodko E.M.^{1,2}, Supilnikova O.V.^{1,3}, Maslennikova I.I.^{1,3}, Enuakashvily N.I.^{1,3}, Kotova A.V.^{1,3},
Bagayeva V.V.^{1,3}, Zolina T.L.¹, Konkina A.I.¹, Yatsemirsky G.S.¹

Establishing a cell culture bank: Pokrovsky Cell Technology Center experience

¹ Cell Technologies Center “Pokrovsky”, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Medicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

³ North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

Abstract. In accordance with the existing regulatory and legal framework, the Center for Cell Technologies “Pokrovsky” has created a bank of cell cultures that meet the requirements for the production of ATMP and BMCP, as well as for basic research. The issues of organization of quality control, passportization, storage of samples are discussed.

Keywords: biobank; bioresource collections; cell culture; quality control of cell cultures; characterization of cell cultures; mesenchymal stromal cells; dental pulp stem cells; HUVEC.

Современные исследования в области клеточной биологии предъявляют высокие требования к используемым модельным объектам, в том числе клеточным культурам. Эти требования продиктованы необходимостью избежать артефактов в работе и снизить потенциальные риски для окружающей среды. В соответствии с существующей нормативно-правовой базой Российской Федерации и мировым опытом в Центре клеточных технологий «Покровский» создан банк клеточных культур персонального и общественного хранения. Для клинических целей клеточные культуры должны быть получены и помещены в биобанк с соблюдением Правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами. Требования к биобанкированию (Приказ Минздрава России от 20.10.2017 N 842н (ред. от 30.01.2019)) являются обязательными при депонировании материала, предназначенного для клинических и доклинических исследований, а также для производства биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) и/или высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП). Помимо этих требований следует также принимать во внимание нормативную базу

Евразийского экономического союза, в частности Решения № 77, 78 Совета Евразийской экономической комиссии, регламентирующие правила производства и регистрации высокотехнологичных лекарственных препаратов. В случае ориентации продукции биобанка на Евразийский союз с целью приготовления сырья для производства ВТЛП необходимо соблюдение принципов всех надлежащих практик: лабораторной — Good Laboratory Practice (GLP), производственной — Good Manufacturing Practices (GMP), хранения — Good Storage Practices (GSP), дистрибуции — Good Distribution Practices (GDP). Подобные требования сформировали запрос на появление и развитие биобанков, соответствующих данным требованиям.

Основная задача Центра заключается в сохранении культур клеток различного происхождения и образцов мононуклеарной фракции (МНФ) пуповинной крови человека для использования в медицинской практике, создания новых клеточных технологий, научных исследований и поддержания биологического разнообразия. В рамках этой задачи с 2021 года Центр включился в работу над проектом по созданию базового депозитария Российской коллекции типовых культур (RTCC) вместе с Институтом цитологии, Институтом биологии развития и Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения РАН. Цель Центра в этом проекте — создание банка культур МСК ранних пассажей из разных источников

Вся деятельность по сбору биологического материала и его последующему хранению осуществляется в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Основные принципы деятельности Покровского банка стволовых клеток — соблюдение конфиденциальности информации, обеспечение безопасности сотрудников, контактирующих с биологическим материалом, доступности биоматериала для научных исследований при анонимности доноров и их добровольном информированном согласии на использование биоматериала.

В процессе создания банка клеточных культур разработана система стандартных операционных процедур, регламентирующих процедуры входной регистрации, анонимизации, обработки материала, процессов культивирования, маркирования и генетической идентификации образцов, криоконсервации. Создана трехэтапная система контроля качества (входной, производственный и выходной контроли).

В коллекции клеточных культур банка насчитывается более 2000 образцов мезенхимных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика частного хранения, 105 образцов донорских МСК пупочного канатика в разделе общественного хранения. Создана коллекция МСК жировой ткани условно здоровых доноров, а также пациентов с рецессивной множественной эпифизарной дисплазией (РМЭД), подтвержденной молекулярно-биологическими методами, МСК костного мозга пациентов с множественной миеломой. Имеются образцы МСК ткани почки, печени, ворсинок хориона. Ценной частью банка культур банка являются клетки, полученные из тканей ротовой полости. Всего получено 79 донорских культур из 43 зубов. Главным достижением стало получение парных культур из различных отделов одного и того же зуба. С помощью методики раздельной обработки периодонта и пульпы удалось выделить 18 пар СК пульпа/периодонт. От ряда доноров удалось получить по три популяции клеток от каждого в разных комбинациях: СК пульпы, периодонта и десны; СК пульпы, периодонта и фолликула; СК пульпы, периодонта и апикальных папилл. В коллекции клеточных культур присутствуют также дермальные и легочные фибробласты пациентов разного возраста и пола, а также образцы культур эндотелия пупочной вены (HUVEC).

Разработанныеходы и алгоритмы работы позволили создать коллекцию культур ранних пассажей, состоящую из паспортизованных образцов, соответствующих требованиям к клеточным культурам для изготовления высокотехнологичных лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов, а также для научных исследований.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1063).

Прокудина Е.С. ✉, Сенокосова Е.А., Антонова Л.В., Кочергин Н.А.

Фиброин шёлка — основа биополимерной сосудистой заплаты: результаты преклинических испытаний

Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово, Россия

✉ goddess27@mail.ru

Аннотация. В работе представлены результаты преклинических испытаний матриц из биополимера — фиброина шелка (ФС). Физико-механические, гемосовместимые, биосовместимые свойства ФС оптимальны. ФС не подвергается кальцификации, ранней биodeградации и может быть использован в качестве сосудистой заплаты.

Ключевые слова: фиброин шелка; биосовместимые материалы; биополимеры; сосудистая заплата; артериальная реконструкция; преклинические испытания.

Prokudina E.S., Senokosova E.A., Antonova L.V., Kochergin N.A.

Silk fibroin is the basis of the biopolymer vascular patch: results of preclinical tests

Research Institute of Complex Issue of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract. The work presents the results of preclinical tests of biopolymer — silk fibroin (SF) matrices. The physicomchanical, hemocompatible, and biocompatible properties of SF are optimal. SF is not subject to calcification or early biodegradation and can be used as a vascular patch.

Keywords: silk fibroin; biocompatible materials; biopolymers; vascular patch; arterial reconstruction; preclinical tests.

Эффективным способом восстановления целостности сосудистой стенки является закрытие ее дефекта заплатой. Применение заплат из существующих материалов может приводить к ряду осложнений. Использование синтетических полимеров ограничено из-за их слабой интеграции с организмом. Применение аутологичного материала также не всегда возможно. Поэтому актуален поиск новых материалов, сочетающих в себе достоинства природных и синтетических полимеров. Фиброин шёлка (ФС) — биосовместимый природный полимер. Из ФС создают трехмерные конструкции, пригодные для заселения клетками. Благодаря биологическим свойствам, низкой иммуногенности и широкой доступности, ФС применяется в регенеративной медицине: восстановление хрящевой и костной тканей, роговицы глаза, заживление кожных ран [1, 2].

В настоящей работе представлены результаты преклинических испытаний матриц из ФС, изготовленных методом электроспиннинга. Оценили физико-механические характеристики ФС, гемосовместимость и матричные свойства в отношении культивирования эндотелиальных клеток линии Eahy 926. Проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) поверхности ФС-матрикса. Для оценки биосовместимости и выявления риска ранней биodeградации и кальцификации ФС, матрицы имплантировали под кожу крысам на срок до 60 суток с гистологическим исследованием эксплантированных образцов. Также ФС-заплаты имплантировали в сонные артерии овцам на 2 и 6 месяцев. Проприодимость сосудов с заплатами оценивали с помощью УЗИ. Ремоделирование и эндотелизацию ФС-заплат исследовали с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ). Эксплантированные образцы заплат изучали с помощью морфологических методов.

Показатели жесткости и эластичности ФС-матриц соответствовали нативным сосудам (a. carotis овцы и a. mammaria человека) [3]. ФС-матрикс вызывал незначительный гемолиз эритроцитов и минимальную

агрегацию тромбоцитов [3]. Биологическая привлекательность ФШ для эндотелиальных клеток, а также цитотоксичность соответствовали материалам сравнения, в том числе уже применяемым в клинической практике (бычий перикард) [3].

После подкожной имплантации ФШ не выявлено признаков его преждевременной деградации, кальцификации, а также выраженного воспаления.

Спустя 2 и 6 месяцев имплантации овцам сонные артерии с ФШ-заплатами были проходимы, без аневризм, гематом, значимых стенозов [4]. В ходе прижизненной ОКТ спустя 6 месяцев имплантации ФШ-заплат выявлена гиперплазия неоинтимы [4]. По данным морфологического исследования ремоделирование ФШ шло с формированием трехслойной структуры наподобие собственной стенки артерии. Внутренняя поверхность сосуда в проекции заплата покрыта монослоем зрелых эндотелиальных клеток. Через 6 месяцев заплата умеренно биодеградировала с замещением собственной тканью сосуда, обнаруживались *vasa vasorum*. Неоинтима в проекции заплата гиперплазирована, наполнена эндотелиоподобными клетками. Адвентиция сформирована коллагеновыми волокнами, фибробластоподобными клетками, васкуляризована. Эластиновые волокна не определялись. Участков кальцификации ФШ не выявлено на всех сроках имплантации [5].

По результатам комплексных преклинических испытаний биополимерная заплата из ФШ пригодна для реконструкции сосудистой стенки. Однако выявленные признаки постимплантационной гиперплазии неоинтимы в проекции имплантированной заплаты требуют дальнейших разработок по улучшению свойств биополимерного матрикса.

Работа выполнена при поддержке комплексной программы фундаментальных научных исследований РАН в рамках фундаментальной темы НИИ КПССЗ № 0419-2022-003 «Разработка новых изделий медицинского назначения для сердечно-сосудистой хирургии. Переход к персонализированной медицине и высокотехнологичному здравоохранению. Создание систем обработки больших объемов данных, машинного обучения и искусственного интеллекта» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках национального проекта «Наука и университеты».

Список литературы

1. Gavrilova N.A., Borzenok S.A., Revishchin A.V., et al. The effect of biodegradable silk fibroin-based scaffolds containing glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the corneal regeneration process // *Int J Biol Macromol.* 2021. Vol. 185. P. 264–276. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.06.040
2. Lehmann T., Vaughn A.E., Seal S., et al. Silk fibroin-based therapeutics for impaired wound healing // *Pharmaceutics.* 2022. Vol. 14, N 3. P. 651. doi: 10.3390/pharmaceutics14030651
3. Prokudina E.S., Senokosova E.A., Antonova L.V., et al. New tissue-engineered vascular matrix based on regenerated silk fibroin: *in vitro* study // *Modern Tehnologies in Medicine* 2023. Vol. 15, N 4. P. 41–48. doi: 10.17691/stm2023.15.4.04
4. Колесников А.Ю., Прокудина Е.С., Сенокосова Е.А. и др. Результаты долгосрочной проходимости и прижизненной визуализации сосудистых заплат из фиброина шелка. Клиническая и экспериментальная хирургия // *Журнал имени академика Б.В. Петровского.* 2023. Т. 11, № 3(41). С. 68–75. EDN: FUZINU doi: 10.33029/2308-1198-2023-11-3-68-75
5. Прокудина Е. С., Сенокосова Е. А., Антонова Л. В., и др. Морфологические особенности ремоделирования биологических и тканеинженерных сосудистых заплат: результаты испытаний на модели овцы // *Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины.* 2023. Т. 38, № 4. С. 250–259. EDN: GCUGDI doi: 10.29001/2073-8552-2023-38-4-250-259

Пронина А.С. ✉, Суворова Г.Н.

Регенерация мышечной ткани внутреннего сфинктера прямой кишки на фоне экспериментального мужского гипогонадизма

ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

✉ a.s.pronina@samsmu.ru

Аннотация. Гипогонадизм не нарушает механизмы репаративной регенерации гладкой мышечной ткани внутреннего сфинктера прямой кишки (ВСПК), однако является фактором, усиливающим воспалительные процессы и гибель миоцитов, замедляет процесс регенерации, а восстановление сфинктера, как органа, происходит преимущественно за счет замещения мышечной ткани соединительнотканым рубцом.

Ключевые слова: гладкая мышечная ткань; андрогенная недостаточность; дефицит тестостерона.

Pronina A.S., Suvorova G.N.

Regeneration of muscle tissue of the internal sphincter of the rectum against the background of experimental male hypogonadism

“Samara State Medical University” of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Samara, Russia

Abstract. Hypogonadism does not disrupt the mechanisms of reparative regeneration of the smooth muscle tissue of the internal sphincter of the rectum (ISRC), but it is a factor that increases inflammatory processes and the death of myocytes, slows down regeneration, and the restoration of the sphincter, as an organ, occurs due to the replacement of muscle tissue with a connective tissue scar.

Keywords: smooth muscle tissue; androgen deficiency; testosterone deficiency.

Гипогонадизм по мужскому типу, или андрогенодефицит — это клиническое состояние, связанное с низкой концентрацией тестостерона или нечувствительностью рецепторного аппарата к андрогенам, которое ведет к негативным воздействиям на множество органов и систем, ухудшая качество жизни [1]. В последнее время клиницисты отмечают, что у мужчин уровень андрогенов начинает уменьшаться с 30 лет, примерно на 1–2% ежегодно. Известно, что частота встречаемости дефицита андрогенов у мужчин в возрасте от 30 до 40 лет составляет около 10–15%, среди мужчин до 50 лет — 15–25%, а среди мужчин старше 50 лет — более 40% [2].

Действие тестостерона на метаболизм и функции мышечных тканей связано с присутствием в них рецепторов к андрогенам. Однако влияние андрогенодефицита на процессы регенерации гладкой мышечной ткани внутренних органов, в том числе внутреннего сфинктера прямой кишки (ВСПК), не изучено. В связи с этим целью данного исследования явилось изучение реактивных изменений и процесса регенерации мышечной ткани внутреннего сфинктера прямой кишки в контроле и в условиях гипогонадизма.

Исследование выполнено на 40 белых лабораторных крысах самцах в возрасте 8 месяцев, массой 300–350 г. Животные были рандомно разделены на 3 группы: 1-я — интактный контроль ($n = 4$); 2-я — контрольная группа, с повреждением ВСПК при физиологическом уровне тестостерона ($n = 18$) и 3-я — экспериментальная группа, с моделированным постнатальным гипогонадизмом путем двухсторонней орхиэктомии и повреждением ВСПК ($n = 18$). Повреждение гладкой мышечной ткани ВСПК проводили с использованием модели перерастяжения анального отверстия, на 45-е сутки после орхиэктомии. Все манипуляции с животными проводились с использованием внутримышечного наркоза. Снижение концентрации тестостерона в сыворотке животных с помощью иммунохемилюминисцентного анализа (ACCESS 2, Beckman Coulter Inc,

США). Материал забирали на 3, 5, 7, 14, 21 и 30-е сутки и подвергали стандартному протоколу приготовления гистологических и ультрамикроскопических препаратов.

Установлено, что процессы деструкции и последующего восстановления гладкой мышечной ткани ВСПК в условиях экспериментально сформированного гипогонадизма протекают аналогично контролю. После чрезмерного растяжения миоциты подвергаются некрозу, теряют межклеточные контакты, отделяются друг от друга, меняют свою ориентацию. Увеличение интерстициального отека сопровождается разобщением миоцитов, относительная площадь интерстиция в 3-й группе на 4,8% превышает аналогичный показатель во 2-й (контрольной) группе и составляет $66,4 \pm 5,06\%$. В цитоплазме миоцитов происходит гомогенизация содержимого: сократительных белков и органоидов, ядра уплотняются, хроматин конденсируется и располагается вдоль кариолеммы, которая становится сильно извилистой, в поврежденных клетках, помимо некротических процессов, запускается апоптоз.

К 5–7-м суткам в экспериментальной группе животных в зоне повреждения сфинктера сохраняется интерстициальный отек. Погибшие клетки отделяются и объединяются соединительной тканью в конгломераты. Повреждение распространяется в прилегающую, прираневающую зону, вызывая некробиотические изменения в миоцитах. В эти сроки в мышечных клетках продолжает наблюдаться вакуолизация цитоплазмы, а в ядрах — уплотнение кариоплазмы. Пространство между клетками увеличивается, плазмолемма становится извилистой. Некоторые клетки прилегающей зоны подвергаются необратимым изменениям и погибают, в то же время часть миоцитов сохраняет жизнеспособность, их ядра содержат значительное число эухроматина, крупные ядрышки, в цитоплазме обнаруживается расширенная гранулярная ЭПС. В область повреждения активно мигрируют гранулоциты и макрофаги.

Однако дистрофическим изменениям и гибели подвергается значительное количество не только зрелых, крупных, но и малых, по-видимому малодифференцированных миоцитов, в результате чего восстановительные возможности поврежденной мышечной ткани ВСПК в экспериментальной группе с постнатальным гипогонадизмом оказываются ограниченными. В результате восстановления органной целостности внутреннего сфинктера происходит в значительной степени за счет перераспределения соединительной ткани из прираневающих, слабо поврежденных областей в раневую зону.

К 30-м суткам зона повреждения сфинктера представлена отдельными пучками мышечных клеток, разделенными толстыми прослойками коллагеновых волокон, по-прежнему с признаками интерстициального отека. Морфометрический анализ этой зоны выявил, что объемная плотность миоцитов составляет $20,8 \pm 4,5\%$, что на 18,8% меньше, чем в контрольной группе. Соединительная ткань преобладает над мышечной тканью в 2,7 раз и составляет 56,8%, что в 15,6% больше, чем в контрольной группе.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что гипогонадизм не нарушает механизмы регенерации мышечной ткани ВСПК. Тем не менее дефицит андрогенов выступает как фактор, который усиливает воспалительные процессы и замедляет процесс восстановления, что в итоге приводит к замещению гладкой мышечной ткани рубцом соединительной ткани в значительно большем, по сравнению с контролем, объеме.

Список литературы

1. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Роживанов Р.В., и др. Рекомендации по диагностике и лечению гипогонадизма (дефицита тестостерона) у мужчин // Проблемы эндокринологии. 2015. Т. 61, № 5. С. 60–71. EDN: VLJVXJ doi: 10.14341/probl201561560-71
2. Лебедева Н.Б., Гофман В.В. Современные представления о роли возрастного гипогонадизма в развитии сердечно-сосудистых заболеваний // Терапевтический архив. 2021. Т. 93, № 1. С. 79–83. EDN: DVZZVW doi: 10.26442/00403660.2021.01.200597

Пуленова М.М.^{1–3} ✉, Кирсова Д.П.^{1–3}, Мызина М.С.^{1,3}, Смирнова О.А.^{4,5}, Липатова А.В.⁴,
Калинкин А.А.⁴, Баклаушев В.П.^{1,4,3}, Юсубалиева Г.М.^{1,4,3}

Доставка таргетных белков в глиомные клетки с помощью рекомбинантных штаммов LIVP

¹ Федеральный научно-клинический центр (ФНКЦ) ФМБА России, Москва, Россия

² Московский физико-технический институт, Москва, Россия

³ Федеральный центр мозга и нейротехнологий (ФЦМН) ФМБА России, Москва, Россия

⁴ Институт молекулярной биологии РАН им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

⁵ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия

✉ midvibi10@gmail.com

Аннотация. Объектом исследования являются экспериментальная модель глиобластомы человека *in vitro*. Цель работы — оценить восприимчивость клеток первичной глиобластомы к рекомбинантным штаммам LIVP, экспрессирующих кДНК CCL3, CCL5 или IL-15. В процессе работы формировались сфероиды из глиомных клеток, проводилась однократная обработка генно-инженерными конструкциями, экспрессирующих кДНК CCL3, CCL5 или IL-15 в составе бицистронной кассеты с красным флуоресцентным белком (tagRFP), наблюдение за изменениями проводилось методом динамической микроскопии с помощью флуоресцентного биоимиджера (Selena, Evos M700) в течение 10–14 дней. Область применения результатов — вирусная и иммунотерапия опухолей головного мозга.

Ключевые слова: глиобластома; иммунотерапия; опухолевые сфероиды; LIVP.

Pulnova M.M.^{1–3}, Kirsova D.P.^{1–3}, Myzina M.S.^{1,3}, Smirnova O.A.^{4,5}, Lipatova A.V.⁴,
Kalinkin A.A.⁴, Baklaushev V.P.^{1,4,3}, Yusubalieva G.M.^{1,4,3}

Delivery of targeted proteins to glioma cells using recombinant LIVP strains

¹ Federal Research and Clinical Center of Specialized Medical Care and Medical Technologies Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia

³ Federal Center for Brain and Neurotechnologies, Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

⁴ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵ Nits Epidemiologii i Mikrobiologii Imeni N.F. Gamalei, Moscow, Russia

Abstract. The subject of the study is an experimental model of human glioblastoma *in vitro*. The aim of the work is to evaluate the susceptibility of primary glioblastoma cells to recombinant strains of LIVP expressing cDNA for CCL3, CCL5, or IL-15. The first, spheroids of glioma cells were formed. A single treatment was conducted using genetically engineered constructs expressing cDNA for CCL3, CCL5, or IL-15. Observations of changes were made using dynamic microscopy with a fluorescent bioimager (Selena, Evos M700) over a period of 10–14 days. The field of application for the results includes viral and immunotherapy for brain tumors.

Keywords: glioblastoma; immunotherapy; tumor spheroids; LIVP.

Мультиформная глиобластома (GMB) имеет низкую иммуногенность и выраженную иммуносупрессивную микросреду опухоли (TME), что ограничивает возможности иммунотерапии. Виротерапия способна воздействовать напрямую и опосредованно на опухолевые клетки, «изменяя» при этом иммунный состав TME [1]. Векторы рекомбинантного вируса LIVP_RFP безопасны в использовании, выдерживают гипоксическую среду

внутри GBM, не требуют специфических рецепторов и могут доставлять большие фрагменты чужеродной ДНК [2, 3]. Ранее были созданы LVP-IL15-RFP и LVP-IL15Ra-RFP, показавшие превосходную онколитическую эффективность на мышах с раком молочной железы [4]. Цитокины IL-15 необходимы для дифференцировки иммунных клеток (Т-лимфоциты и NK-клетки) и поддержания их цитотоксического потенциала. Наиболее важным его свойством является участие в пролиферации и увеличении длительности выживания CD8+ Т-клеток памяти. Хемокины CCL3 и CCL5 — воспалительные хемокины, привлекающие иммунные клетки к очагу воспаления. Хемокины могут влиять на прогрессирующие опухоли путём активации опухоль-ассоциированных клеток в микроокружении. В качестве объекта исследования выбраны простые и сложные опухолевые сфероиды, сформированные из клеток глиобластомы и стромальных или эндотелиальных клеток. Цель работы — отследить патоморфологические изменения в сфероидах после их однократной обработки генно-инженерными конструкциями, экспрессирующими кДНК CCL3, CCL5 или IL-15 в составе бицистронной кассеты с красным флуоресцентным белком (tagRFP).

Культура первичной глиобластомы человека получена в Лаборатории клеточных технологий ФНКЦ ФМБА (Протокол № 16 от 30 сентября 2017). Из первичной культуры глиобластомы человека формировали простые сфероиды по 3000 глиомных клеток или в сочетании последних и стромальных или эндотелиальных клеток в равном соотношении. На 5-е сутки после формирования сфероида с центральным ядром некроза и активной пролиферацией по поверхности вносили в геометрической прогрессии LVP-CCL3-RFP или LVP-CCL5-RFP или LVP-IL15-RFP, начиная с концентрации в 10×6 БОЭ (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи). Динамическая микроскопия сфероидов проводилась ежедневно с помощью прибора EVOS M700. В дублирующем планшете каждые три дня из лунок со сфероидами с заменой на свежую питательную среду отбирали по 50 мкл кондиционированной среды для исследования экспрессии целевых белков в клетках. Согласно предварительным результатам, после однократной обработки LVP-CCL3-RFP или LVP-CCL5-RFP или LVP-IL15-RFP в лунках со сфероидами наблюдался дозозависимый цитопатический эффект. Отмечена положительная корреляция с длительностью инкубации с рекомбинантными штаммами. Дополнительно отмечали равномерное распределение сигнала от RFP по всему сфероиду. Такая картина не наблюдалась в лунках с контрольными сфероидами, куда не вносились рекомбинантные штаммы. Полученные микроскопические исследования планируются подтвердить количественным определением экспрессии целевых белков в клетках и кондиционированной среде методом иммуноферментного или мультиплексного анализа.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда № 22-64-00057 «Комбинированная терапия экспериментальной глиобластомы с помощью “усиленных” NK-клеток, активированных опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов и модифицированных онколитических вирусов».

Список литературы

1. Bugakova A.S., Chudakova D.A., Myzina M.S., et al. Non-tumor cells within the tumor microenvironment—the «eminence grise» of the glioblastoma pathogenesis and potential targets for therapy // *Cells*. 2024. Vol. 13, N 10. P. 808.
2. Hamad A., Yusubalieva G.M., Baklaushev V.P., et al. Recent developments in glioblastoma therapy: oncolytic viruses and emerging future strategies // *Viruses*. 2023. Vol. 15, N 2. P. 547.
3. Vasileva N., Ageenko A., Byvakina A., et al. The recombinant oncolytic virus VV-GMCSF-lact and chemotherapy drugs against human glioma // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 8. P. 4244. doi: 10.3390/ijms25084244
4. Shakiba, Yasmin et al. Oncolytic therapy with recombinant vaccinia viruses targeting the interleukin-15 pathway elicits a synergistic response // *Mol Ther Oncolytics*. Vol. 29. P. 158–168. doi: 10.1016/j.omto.2023.05.002

Пшеничникова О.С. ✉, Селиванова Д.С., Зозуля Н.И., Сурин В.Л.

Выбор потенциальных мишеней для генной терапии наследственного дефицита фактора свертывания крови FVII в российской популяции

ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия

✉ pshenichnikovaolesya@gmail.com

Аннотация. Описан мутационный спектр гена F7 у пациентов с дефицитом фактора FVII в российской популяции. Выявлен мажорный патогенный вариант — микроделеция европейского происхождения с.1391delC (p.Pro464Hisfs*32). Ее можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для генной терапии.

Ключевые слова: дефицит фактора свертывания крови FVII; ген F7; мутационный спектр; генная терапия.

Pshenichnikova O.S., Selivanova D.S., Zozulya N.I., Surin V.L.

The choice of potential targets for gene therapy of inherited deficiency of blood clotting factor FVII in Russian population

National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

Abstract. The mutation spectrum of the F7 gene in patients with FVII deficiency in the Russian population is described. A major pathogenic variant, a microdeletion of European origin c.1391delC (p.Pro464Hisfs*32), was identified. It can be considered as a potential target for gene therapy.

Keywords: deficiency of blood clotting factor FVII; gene F7; mutation spectrum; gene therapy.

Наследственный дефицит фактора свертывания крови FVII (MIM# 227500) — редкое аутосомно-рецессивное заболевание системы свертывания крови с частотой встречаемости в мировой популяции 1:300000 – 1:500000 человек. Это моногенное заболевание, причиной которого служат патогенные варианты в гене F7. На данный момент в международных базах данных описан 271 уникальный вариант в этом гене. Фактор FVII — это белок, который запускает весь каскад свертывания крови и играет в нем ключевую роль, так как полное отсутствие этого белка не совместимо с жизнью. Клинические проявления варьируют от отсутствия симптомов до жизнеугрожающих кровотечений в ЖКТ или кровоизлияний в ЦНС. Для распространенных коагулопатий, гемофилии А и В, уже более 20 лет ведется разработка генотерапевтических препаратов, однако в случае более редких нозологий этот процесс находится в самом начале пути. Немало этому способствует и отсутствие данных по популяционным спектрам для таких нозологий, что обусловлено их редкостью. В связи с этим с целью выявления потенциальных мишеней для генной терапии пациентов с дефицитом фактора FVII в рамках данного исследования мы описали мутационный спектр гена F7 в российской популяции. В исследование было включено 60 неродственных пациентов с первичным диагнозом дефицит фактора FVII разной степени тяжести. ДНК выделяли из клеток периферической венозной крови. Поиск патогенных вариантов осуществляли методом секвенирования по Сэнгеру всех функционально-значимых регионов гена F7 (466 п.н. промотора, экзоны 1–9 и экзон-интронные сочленения). Патогенные варианты в гене F7 были выявлены у 43 из 60 пациентов (71,7%). Всего выявлено 26 различных генных нарушений: 18 миссенс-мутаций, 1 фреймшифт, 2 микроделеции без сдвига рамки считывания, 2 мутации сплайсинга и 3 регуляторных нарушения. Семь вариантов ранее описаны не были. В нашей популяции выявлен мажорный патогенный вариант — с.1391delC (p.Pro464Hisfs*32), это микроделеция европейского

происхождения. В Восточной Европе, как и у нас, она распространена в сцеплении с функциональными полиморфизмами rs36209567 и rs6046. В нашей выборке данная микроделеция встретилась с частотой 33 аллеля у 25 пациентов. Это составляет 46,5% от всех выявленных аллелей с патогенными вариантами, что указывает на то, что данный патогенный вариант можно рассматривать в качестве потенциальной мишени для генной терапии. Генная терапия была бы особенно актуальной для пациентов с гомозиготным носительством этого варианта и для компаундов, сочетающих носительство данного и другого патогенного вариантов, так как у них значительно снижается активность FVII, что повышает риски для здоровья. Мутации со сдвигом рамки считывания представляют собой не самый простой объект для генного редактирования, в отличие от нонсенс-мутаций или нарушений сплайсинга. Тем не менее было показано успешное применение tailed duplex DNA [1], нуклеаз с цинковыми пальцами (zinc finger nucleases) [2] и CRISPR/Cas9 для коррекции фреймшифтов [3]. В дальнейшем мы планируем оценить, какие из разработанных на данный момент методов генной терапии могут быть максимально эффективными для редактирования выявленной нами распространенной микроделеции.

Список литературы

1. Tsuchiya H., Sawamura T., Harashima H., et al. Correction of frameshift mutations with single-stranded and double-stranded DNA fragments prepared from phagemid/plasmid DNAs // *Biol Pharm Bull.* 2005. Vol. 28, N 10. P. 1958–1962. doi: 10.1248/bpb.28.1958
2. Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases // *Nature.* 2005. Vol. 435, N 7042. P. 646–651. doi: 10.1038/nature03556
3. Liu L., Zou L., Li K., et al. Template-independent genome editing in the Pcdh15av-3j mouse, a model of human DFNB23 nonsyndromic deafness // *Cell Rep.* 2022. Vol. 40, N 2. doi: 10.1016/j.celrep.2022.111061

Пыхтина П.А. ✉, Кобзев М.В., Хабекирова С.А.

Возможность применения В-дефензина в регенеративной биомедицине в комбинации с секретомом МСК

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

✉ poly.vorobushek.99@bk.ru

Аннотация. Приведены результаты эксперимента, в ходе которого сравнивалась жизнеспособность эмбриональных фибробластов мыши при воздействии различных концентраций β -дефензина и секретома МСК. Секретом МСК обладает цитопротективными свойствами, что подтверждается статистически значимыми результатами.

Ключевые слова: секретом МСК; цитопротективные свойства; β -дефензин.

Pykhtina P.A., Khabekirova S.A., Kobzev M.V.

The possibility of using B-defensin in regenerative biomedicine in combination with the secretome of mesenchymal stem cells

FSBEO HE Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. The work is based on the results of an experiment comparing the viability of mouse embryonic fibroblasts when exposed to different concentrations of β -defensin and MSCs' secretome. It was found that the secretions of MSCs have cytoprotective effect, as confirmed by statistically significant results.

Keywords: MSCs secretome; cytoprotective properties; β -defensin.

Применение бесклеточных технологий, при которых используются только внеклеточные продукты жизнедеятельности стволовых клеток, сопоставимо по эффективности с применением самих клеток и представляется более биологически безопасным [1]. На сегодняшний день основным материалом для разработки бесклеточных продуктов являются внеклеточные везикулы, в том числе экзосомы мезенхимальных стволовых клеток (МСК), входящие в состав их секретомы. Как инструмент межклеточной коммуникации экзосомы обладают рядом преимуществ [2]. Во-первых, наноразмерные экзосомы могут быть легко перенесены между клетками. Во-вторых, структура липидного бислоя экзосом обеспечивает защищенную среду от деградации биоактивных молекул во внеклеточной среде. В-третьих, экзосомы со специфическими поверхностными белками могут быть таргетированы к определенным органам. Это позволяет предположить, что экзосомы являются транспортерами, которые могут быть использованы для доставки терапевтических препаратов, РНК или белков к поврежденным тканям. При этом одной из основных проблем при культивировании клеток является микробная контаминация. Возможным методом деконтаминации клеточных культур может являться внесение в среду с культивируемыми клетками антимикробных пептидов, в частности дефензинов [3]. Однако дефензины могут обладать в том числе неспецифической цитотоксической активностью, что ограничивает их применение в регенеративной биомедицине. Мы предполагаем, что экзосомы МСК способны нивелировать цитотоксические свойства β -дефензина.

В проведенном эксперименте первичные культуры МСК жировой ткани мыши получали путем ферментативной дезагрегации коллагеназой 200 ЕД/мл (БиолоТ) в течение 4 часов и культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки (Gibco) без антибиотика в культуральных флаконах площадью 25 см² (Thermo Scientific) при 37°C и 5% CO₂. Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения 80–90% конfluence клетки отделяли с помощью 0,25% раствора

трипсина (БиолоТ), подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток Luna-FL (Logos Biosystems) и пересевали в новые флаконы. Для получения секрета на 3-м пассаже некоммитированные МСК помещали в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч, после чего супернатант отбирали для дальнейшей его фильтрации и центрифугирования. Эксперимент проводился на эмбриональных фибробластах мыши линии СЗНА (БиолоТ). Клетки рассеивались в лунки 24-луночного культурального планшета (Thermo Scientific) по $2 \cdot 10^4$ живых клеток в 500 мкл полной среды. Лунки, содержащие в среде рекомбинантный человеческий дефензин DEFb103A (Cloud-Clone Corp.) в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл, делили на 4 группы и в 3 из них добавляли по 5, 10 и 20 мкл секрета МСК. Жизнеспособность клеток определяли через 96 часов с помощью набора EZ4U (Biomedica) в соответствии с рекомендациями производителя. Измеряли оптическое поглощение раствора с использованием многофункционального фотометра-имиджера Cytation 1 (BioTek) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли оптическую плотность относительно отрицательного контроля (внесение β -дефензина без секрета МСК) в %. Наиболее выраженный эффект от введения в среду секрета МСК наблюдался при концентрации дефензина 20 мкг/мл. Жизнеспособность клеток при добавлении 5 и 20 мкл секрета МСК значительно увеличилась и составила $147,15\% \pm 9,703\%$ ($t = 2,274$, $p < 0,1$) и $164,02\% \pm 7,742\%$ ($t = 3,219$, $p < 0,05$) соответственно. При концентрации дефензина 5 мкг/мл жизнеспособность клеток при добавлении 10 и 20 мкл секрета МСК составила $141,12\% \pm 24,640\%$ ($t = 1,596$, $p < 0,2$) и $157,36\% \pm 9,272\%$ ($t = 4,803$, $p < 0,001$). Статистически достоверно, что группа клеток при добавлении 5 мкг/мл дефензина (контроль) обладала наименьшей жизнеспособностью по сравнению с клетками, к которым добавили 20 мкг/мл дефензина и 20 мкл секрета МСК ($148,06\% \pm 6,989\%$, $t = 4,679$, $p < 0,05$), что свидетельствует о снижении цитотоксичности дефензина при добавлении секрета МСК. При сравнении группы клеток с добавлением 5 мкг/мл дефензина и группы клеток с добавлением 5 мкг/мл дефензина и 10 мкл секрета МСК ($141,12\% \pm 24,64\%$, $t = 1,596$) отмечается тенденция к увеличению жизнеспособности клеток. Стоит отметить, что снижение концентрации дефензина также положительно влияло на жизнеспособность клеток. Жизнеспособность клеток, с добавлением 20 мкг/мл дефензина и 20 мкл секрета МСК, составила $148,06\% \pm 6,989\%$ ($t = 4,679$, $p < 0,05$), в то время как группа клеток при добавлении 10 мкг/мл дефензина и 20 мкл секрета МСК обладала большей жизнеспособностью практически на 10% ($162,40\% \pm 10,080\%$, $t = 4,959$, $p < 0,05$).

Таким образом, полученные данные указывают, что при добавлении секрета МСК в различных концентрациях происходит увеличение жизнеспособности клеток опытных групп. На основании этого возможно предположить наличие цитопротективного эффекта секрета МСК при его введении в среду вместе с β -дефензином.

Список литературы

1. Диденко Н.Н., Серенко Т.В., Диденко М.О. Возможность применения секрета стволовых клеток производных нервного гребня в экспериментальной терапии болезни Альцгеймера. В кн.: Неделя науки — 2021: материалы международного молодежного форума. Ставрополь, 22–26 ноября 2021 года. Ставрополь: Ставропольский государственный медицинский университет, 2021. С. 356–358. EDN: LEJNQO
2. Сагарадзе Г.Д., Ефименко А.Ю., Макаревич, О.А., и др. Секретом мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) человека как основа для создания новых препаратов и биоматериалов для регенеративной медицины // Гены и Клетки. Т. 12, № 3. С. 211–212. EDN: YZLDIL
3. Диденко Н.Н., Бойко Е.М., Чагаров А.А., и др. Влияние экзосом мезенхимных стволовых клеток и дефензина на биосовместимость материала для замещения костно-хрящевых дефектов // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2023. Т. 18, № 4. С. 406–408. EDN: NIIJEK doi: 10.14300/mnnc.2023.18096

Пятина К.В.^{1,2} ✉, Звягина А.И.^{1,2}, Минайчев В.В.^{1,2}, Кобякова М.И.³, Смирнов И.В.^{1,2},
Смирнова П.В.^{1,2}, Тетерина А.Ю.^{1,2}, Фадеева И.С.^{1,2}

Импрегнированные кальций-фосфатными соединениями коллагеновые мембраны: новый подход создания барьерных мембран с остеоиндуктивными свойствами для направленной регенерации костной ткани

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия

² Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

³ Институт клинической и экспериментальной лимфологии — филиал ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ kirapyatina01@gmail.com

Аннотация. В работе исследованы способы получения бесклеточной матрицы на основе коллагена и разработан способ ее импрегнирования кальций-фосфатными соединениями. Полученные результаты могут быть использованы при создании эффективных материалов для направленной регенерации костной ткани.

Ключевые слова: направленная регенерация тканей; коллагеновые барьерные мембраны; биосовместимость; кальций-фосфатные соединения; дикальцийфосфата дигидрат.

Pyatina K.V.^{1,2}, Zvyagina A.I.^{1,2}, Minajchev V.V.^{1,2}, Kobyakova M.I.³, Smirnov I.V.^{1,2}, Smirnova P.V.^{1,2},
Teterina A.Yu.^{1,2}, Fadeeva I.S.^{1,2}

Collagen membranes impregnated with calcium phosphate compounds: a new approach to the creation of barrier membranes with osteoinductive properties for targeted bone regeneration

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of the RAS, Pushchino, Russia

² A.A. Baykov Institute of Metallurgy and Materials Science of the RAS, Moscow, Russia

³ Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of ICIG SD RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. In this study, methods for producing a cell-free collagen-based matrix have been investigated, and a technique for impregnating it with calcium phosphate compounds has been developed. The findings obtained can be utilized to develop effective materials for targeted bone regeneration purposes.

Keywords: directed tissue regeneration; collagen barrier membranes; biocompatibility; calcium phosphate compounds; dicalcium phosphate dihydrate.

Современные барьерные мембраны на основе коллагена, применяющиеся в челюстно-лицевой хирургии для направленной регенерации костной ткани, до сих не соответствуют всем требованиям успешной регенерации тканей. Для них характерны неконтролируемая резорбция, ведущая к потере их барьерной функции, и отсутствие индуктивного действия по отношению к регенерирующей кости [1]. Данные недостатки можно нивелировать путём создания условий предимплантационной обработки материалов, обеспечивающих максимальную сохранность внеклеточного матрикса (ВКМ). В свою очередь, известно, что прекурсоры гидроксиапатита (ГАп) обладают выраженными остеоиндуктивными свойствами и способны к трансформации в нативный гидроксиапатит [2], следовательно, одностороннее импрегнирование кальций-фосфатных

соединений (КФС) на поверхность барьерной мембраны, прилежащей к дефекту кости, может значительно усилить их регенераторный эффект. В данной работе было проведено исследование, включавшее анализ морфологических изменений и степени биосовместимости ксеногенного перикарда после различных способов децеллюляризации, а также подбор КФС для импрегнирования.

Для создания бесклеточной матрицы были использованы фрагменты бычьего перикарда. Часть фрагментов подвергалась обработке раствором липофильного детергента дезоксихолата натрия моногидрата (ДХНм), другая часть — обработке гипотоническим раствором.

Результаты оценки эффективности децеллюляризации и сохранности полученных матриц показали наилучшее удаление клеточного компонента в материалах после обработки ДХНм. Это подтверждалось отсутствием клеток на гистологических препаратах и низким содержанием остаточной донорской ДНК в образцах в сравнении с нативным перикардом по данным адсорбционной спектроскопии. Гистохимический анализ показал сохранение структуры коллагеновых волокон, что является положительной характеристикой, обеспечивающей пролонгированный срок резорбции материала в организме реципиента. Обработка гипотоническим раствором оказалась менее эффективной ввиду сохранения некоторой части клеточного компонента перикарда и большего содержания остаточной донорской ДНК в сравнении с обработкой ДХНм, что может вызвать развитие иммунного ответа при имплантации. Также выявлено повреждение структуры матрикса, заключающееся в разрыхлении коллагеновых волокон, что может привести к снижению механической прочности и, как следствие, к преждевременной резорбции и потере барьерной функции материала.

Для исследования биологических свойств *in vivo* полученных материалов была использована модель гетеротопической подкожной имплантации крысам сроком на 13 недель. Морфогистохимическое исследование показало, что материалы после обработки ДХНм показали выраженные признаки биосовместимости и полное отсутствие негативной иммунологической реакции. В то время как материалы после обработки гипотоническим раствором вызывали хроническое воспаление и были подвержены более ранней деградации вследствие повреждения ВКМ. В этой связи в качестве матрицы для импрегнирования были взяты материалы после обработки ДХНм.

Для улучшения остеоиндуктивных свойств барьерных мембран в качестве КФС для импрегнирования было проведено *in vitro* исследование биологических свойств дикальцийфосфата дигидрата (ДКФД), октакальцийфосфата (ОКФ) и ГАп, проводившееся на клеточной культуре макрофагоподобных клеток ТНР-1РМА и включавшее оценку жизнеспособности клеток, фагоцитарной активности и секреции провоспалительных цитокинов.

Результаты *in vitro* исследования показали, что исследуемые КФС подавляли фагоцитарную активность и увеличивали секрецию провоспалительных цитокинов клетками ТНР-1РМА, однако ДКФД оказывал наименьшее стимулирующее действие на секрецию ФНО- α , что может снижать риск воспаления и отторжения имплантата. Также ДКФД не снижал лизосомальную активность клеток, что свидетельствовало о его лучших биологических свойствах по сравнению с ОКФ и ГАп, в связи с чем именно ДКФД был выбран для импрегнирования.

Таким образом, на поверхность коллагеновой матрицы после обработки ДХНм методом осаждения из раствора импрегнировали ДКФД (заявка на патент РФ). Данные микрокомпьютерной томографии и сканирующей электронной микроскопии показали равномерное распределение частиц ДКФД на поверхности мембраны в виде округлых кристаллических полусфер, подтверждающее успешность импрегнирования.

Таким образом, в работе показано, что коллагеновая барьерная мембрана, односторонне импрегнированная ДКФД, может быть создана и в дальнейшем эффективно использована для направленной регенерации костной ткани. Авторы полагают, что за счет обеспечения стабильной барьерной функции, минимизации риска воспалительных осложнений и направленного локализованного остеиндуктивного действия на дефицитную костную ткань можно сбалансировать скорость резорбции мембраны и эффективно повысить регенерацию костной ткани.

Работа выполнена в рамках государственного задания ИТЭБ РАН, при финансовой поддержке фонда РФФИ в рамках проекта № 24-73-10208 с использованием приборной базы ЦКП ИТЭБ РАН и ИМЕТ РАН.

Список литературы

1. Benic G.I., Hämmerle C.H.F. Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration // *Periodontology* 2000. 2014. Vol. 66, N 1. P. 13–40. doi: 10.1111/prd.12039
2. Shamrai V.F., Karpikhin A.E., Fedotov A.Y., et al. Structural changes during the hydrolysis of dicalcium phosphate dihydrate to octacalcium phosphate and hydroxyapatite // *Inorganic Materials*. 2015. Vol. 51, N 4. P. 355–361. EDN: UFPTFZ doi: 10.1134/S0020168515040147

Пяткова М.А.^{1,2} ✉, Плешкова А.И.^{1,2}, Надараиа К.В.¹, Пономаренко А.И.³, Манжуло И.В.³, Герасименко М.С.^{1,2}, Белов Е.А.¹, Осьмушко И.С.¹, Имшенецкий И.М.¹, Машталяр Д.В.¹

Биоактивные свойства гибридных покрытий с менахиноном-7, полидофамином, золедронатом и ванкомицином для костных имплантатов

¹ Институт Химии ДВО РАН, Владивосток, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³ Национальный научный центр морской биологии имени А.В. Жирмунского, Владивосток, Россия

✉ piatkova.mariia.al@gmail.com

Аннотация. В работе изучены морфология и состав гибридных покрытий, содержащих менахинон-7, ванкомицин, золедронат и полидофамин. Исследована цитотоксичность полученных слоев, представлены результаты *in vivo* испытаний острой токсичности на самцах крыс линии Wistar.

Ключевые слова: плазменное электролитическое оксидирование; биоактивные покрытия; гидроксиапатит; магниевые имплантаты; титановые имплантаты; менахинон-7; золедронат; полидофамин; ванкомицин.

Piatkova M.A.^{1,2}, Pleshkova A.I.^{1,2}, Nadaraia K.V.¹, Ponomarenko A.I.³, Manzhulo I.V.³, Gerasimenko M.S.^{1,2}, Belov E.A.¹, Osmushko I.S.¹, Imshinetskiy I.M.¹, Mashtalyar D.V.¹

Bioactive properties of the hybrid coatings with menaquinone-7, polydopamine, zoledronate and vancomycin for bone implants

¹ Institute of Chemistry FEB RAS, Vladivostok, Russia

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

³ A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. In this work, the morphology and composition of hybrid coatings containing menaquinone-7, vancomycin, zoledronate and polydopamine were studied. The cytotoxicity of the obtained layers was investigated, and the results of *in vivo* acute toxicity tests on male Wistar rats are presented.

Keywords: plasma electrolytic oxidation; bioactive coatings; hydroxyapatite; magnesium implants; titanium implants; menaquinone-7; zoledronate; polydopamine; vancomycin.

В настоящее время существует острая необходимость в разработке материалов для имплантатов, обладающих важными биоактивными свойствами, к примеру остеоиндуктивными, антибактериальными и антирезорбтивными, а также отличающихся низкой себестоимостью и простотой в производстве. Технология плазменного электролитического оксидирования (ПЭО) позволяет синтезировать кальций-фосфатные слои на вентильных металлах и сплавах, к которым относятся титановые и магниевые имплантаты [1–2], все чаще применяемые в хирургии и ортопедии. В данной работе на магниевой и титановой подложке было сформировано кальций-фосфатное ПЭО-покрытие, в которое поэтапно внедрили менахинон-7, обладающий остеоиндуктивными свойствами [3], и такие водорастворимые соединения, как ванкомицин и золедронат в составе полидофаминовой пленки.

Морфология и состав полученных гибридных слоев были изучены методами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии (РФЭС) соответственно. Покрытия имеют развитую структуру поверхности, характерную для ПЭО-слоев. Согласно результатам РФЭС, в составе

полученных гибридных слоев как на магниевой, так и на титановой подложке детектируются функциональные группы всех внедряемых биоактивных соединений. Исследована жизнеспособность фибробластов мышцы (NIH/3T3) и клеток остеосаркомы человека (MNNG/HOS) методом МТТ в присутствии обогащенной среды, в которой выдерживались имплантаты. Согласно результатам экспериментов, внедряемые в гибридные слои соединения способствуют снижению жизнеспособности клеток остеосаркомы без влияния на фибробласты, что наблюдается при исследовании покрытий как на магниевой, так и на титановой подложке. Представленные результаты *in vivo* испытаний острой токсичности на самцах крыс линии *Wistar*, клинического и биохимического анализа крови лабораторных животных, а также изображения поверхности извлеченных имплантатов, полученные методом СЭМ, не выявили какого-либо токсичного эффекта у имплантатов. Таким образом, на основании данных, полученных спустя 14 суток после имплантации, можно сделать предварительный вывод об отсутствии токсического влияния как веществ, внедряемых в гибридное покрытие, так и самого покрытия.

Список литературы

1. Nadaraia K.V., Mashtalyar D.V., Piatkova M.A., et al. Antibacterial HA-coatings on bioresorbable Mg alloy // *J Magnes Alloys*. 2024. Vol. 12, N 5. P. 1965–1985. doi: 10.1016/j.jma.2024.05.006
2. Mashtalyar D.V., Nadaraia K.V., Gnedenkov A.S., et al. Bioactive coatings formed on titanium by plasma electrolytic oxidation: composition and properties // *Materials*. 2020. Vol. 13, N 18. P. 4121. doi: 10.3390/ma13184121.
3. Akbulut A.C., Wasilewski G.B., Rapp N., et al. Menaquinone-7 supplementation improves osteogenesis in pluripotent stem cell derived mesenchymal stem cells // *Front Cell Dev Biol*. 2021. Vol. 8. doi: 10.3389/fcell.2020.618760

Раднаева А.В.^{1,2}✉, Кудряшова Е.В.³, Злотников И.Д.³, Еремичев Р.Ю.¹, Слободкина Е.А.¹, Макаревич П.И.^{1,2}

Изучение генотерапевтической конструкции на основе плазмидной ДНК и поликатионных соединений для увеличения эффективности трансфекции *in vitro* и *in vivo*

¹ Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Химический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ arina.radnaeva05@gmail.com

Аннотация. Невирусные системы доставки плазмидной ДНК на основе поликатионов показали высокую эффективность трансфекции *in vitro*. Однако существует необходимость в оптимизации систем для исследований *in vivo* из-за риска преципитации комплексов полимер-пДНК, высокой токсичности и отсутствия трансфекции.

Ключевые слова: генная терапия; невирусные системы доставки; поликатионы; хитозан; ПЭИ; ПЭГ; плаزمида.

Radnaeva A.^{1,2}, Kudryashova E.³, Zlotnikov I.³, Eremichev R.¹, Slobodkina E.¹, Makarevich P.^{1,2}

Study of a gene therapy construct based on plasmid DNA and polycationic compounds to increase transfection efficiency *in vitro* and *in vivo*

¹ Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Non-viral polycation-based plasmid DNA delivery systems have shown high transfection efficiency *in vitro*. However, there is a need to optimize the systems for *in vivo* studies due to obstacles such as precipitation of polymer-pDNA complexes, high toxicity, and lack of efficient transfection.

Keywords: gene therapy; non-viral delivery systems; polycations; chitosan; PEI; PEG; plasmid.

Генная терапия, основанная на введении локально или в системный кровоток незащищенной специфическим носителем нуклеиновой кислоты, обладает низкой эффективностью по причине наличия множества факторов, препятствующих трансфекции: деградация нуклеиновых кислоты под действием нуклеаз, отсутствие систем в структуре молекулы для таргетной доставки и отрицательный заряд на поверхности молекулы нуклеиновой кислоты, что препятствует взаимодействию с клеточной мембраной. Следовательно, для развития методов генной терапии необходимо разработать безопасные и эффективные векторные системы.

Среди систем доставки генетического материала существуют вирусные векторы, которые обладают эффективной трансдукцией и высоким уровнем экспрессии генов, их основными недостатками являются нежелательные иммунные реакции, возможная токсичность, инсерционный мутагенез, низкая нагрузочная способность [1]. Невирусные векторы имеют лучший по сравнению с вирусным профиль безопасности и высокую нагрузочную способность. Одним из наиболее перспективных подходов к повышению селективности является применение коллоидных систем доставки, позволяющих повысить концентрацию лекарства в мишени — органе или клетке.

В данном исследовании рассматривались поликатионные системы на основе линейного биоразлагаемого полисахарида хитозана (Chit), известного трансфецирующего агента полиэтиленамина (PEI),

распространенного модифицирующего агента для таргетных систем — полиэтиленгликоля (PEG) и природного полисахарида триманилида (triman). Для нивелирования токсичности некоторых компонентов систем и подбора оптимальной поликатионной структуры были выбраны три комплекса — Chit-PEI (хитозан-полиэтиленамин); Chit-PEG (хитозан-полиэтиленгликоль) и PEI-triman (полиэтиленамин-триманилид) [2, 3].

Изучение эффективности трансфекции плазмидной ДНК (пДНК) в комплексе с полимерными соединениями происходило в два этапа — *in vitro* и *in vivo*. В исследованиях *in vitro*, на этапе которых происходили отработка протокола трансфекции, подбор оптимального N:P соотношения и оценка эффективности трансфекции поликатионных комплексов с пДНК в клетки HEK293T, в качестве плазмидной ДНК была выбрана плазида, несущая ген GFP. Оценка эффективности трансфекции производилась методами микроскопии и проточной цитометрии. По результатам исследования *in vitro* поликатион Chit-PEG оказался значительно менее эффективен по сравнению с Chit-PEI и PEI-triman даже при условии отсутствия сыворотки в клеточной среде. Chit-PEI и PEI-triman показали высокую эффективность трансфекции в соответствии с уже имеющимися литературными данными о поликатионах схожего строения [4]. Данные два кандидата среди исходных векторных структур были отобраны на дальнейшие *in vivo* исследования.

В исследованиях *in vivo* на мышах была выбрана плазида, несущая маркерный ген β -галактозидазы. Инъекция растворов полимер-пДНК либо «голой» плазмиды в разных растворителях производилась в переднюю большеберцовую мышцу — *m. tibialis anterior*. Умерщвление и забор гистологического материала для дальнейшей окраски происходили на 3-й день после инъекции.

На этапе *in vivo* экспериментов мы столкнулись с возможностью преципитации комплексов полимер-пДНК при высоких концентрациях компонентов системы. Для устранения данной проблемы был предложен метод обессоливания растворителя. Однако в ходе исследования нами было отмечено интересное наблюдение — в контрольных растворах «голой» пДНК в отсутствие хлорида натрия в физиологической концентрации трансфекция *in vivo* не происходила.

По результатам исследования комплексов полимер-пДНК *in vivo* была оценена токсичность инъекционных растворов. После введения Chit-PEI наблюдалось образование обширной зоны некроза, тогда как PEI-triman оказывал более мягкое воздействие на мышечную ткань. По эффективности трансфекции, к сожалению, ни один из рассматриваемых кандидатов на разработку поликатионной векторной системы не показал наличие β -галактозидазной активности, что указывает на необходимость дальнейшей оптимизации поликатионных комплексов для эффективной генной терапии.

Список литературы

1. Pan D., Büning H., Ling C. Rational design of gene therapy vectors // *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2019. Vol. 12. P. 246–247. doi: 10.1016/j.omtm.2019.01.009
2. Zlotnikov I.D., Streltsov D.A., Belogurova N.G., et al. Chitosan or cyclodextrin grafted with oleic acid self-assemble into stabilized polymeric micelles with potential of drug carriers // *Life (Basel)*. 2023. Vol. 13, N 2. P. 446. doi: 10.3390/life13020446
3. Gantenbein B., Tang S., Guerrero J., et al. Non-viral gene delivery methods for bone and joints // *Front Bioeng Biotechnol*. 2020. Vol. 8. doi: 10.3389/fbioe.2020
4. Zhang H., Bahamondez-Canas T.F., Zhang Y., et al. PEGylated chitosan for nonviral aerosol and mucosal delivery of the CRISPR/Cas9 system *in vitro* // *Mol Pharm*. 2018. Vol. 15, N 11. P. 4814–4826. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.8b00434

Ратушняк М.Г. ✉, Родина А.В., Губани Д.Ф., Шапошникова Д.А., Москалева Е.Ю.

Повышение выживаемости облученных НСК с помощью экзосом стволовых клеток и особенности их накопления в разных клетках головного мозга

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ ratushnyak_marya@mail.ru

Аннотация. Показана способность экзосом НСК и МСК мыши и МСК человека повышать выживаемость облученных НСК *in vitro* и накапливаться в НСК и микроглии SIM-A9 более интенсивно, чем в нейронах и астроцитах, дифференцированных из НСК. При интраназальном введении экзосомы накапливались в коре и гиппокампе.

Ключевые слова: экзосомы; нейральные стволовые клетки; мезенхимальные стволовые клетки; головной мозг; нейроны; астроциты; микроглия.

Ratushnyak M.G., Rodina A.V., Gubani D.F., Shaposhnikova D.A., Moskaleva E.Yu.

Increasing the survival of irradiated NSCs using stem cell exosomes and features of their accumulation in different brain cells

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. The ability of exosomes from mouse NSCs and MSCs and human MSCs to increase the survival of irradiated NSCs *in vitro* and accumulate in NSCs and SIM-A9 microglia more intensively than in neurons and astrocytes differentiated from NSCs has been demonstrated. When administered intranasally, exosomes accumulated in the cortex and hippocampus.

Keywords: exosomes; neural stem cells; mesenchymal stem cells; brain; neurons; astrocytes; microglia.

В отдаленный период после лучевой терапии опухолей мозга и опухолей в области головы и шеи с высокой частотой наблюдаются осложнения в виде нарушений когнитивных функций разной степени тяжести. В их основе так же, как при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, при травмах мозга и инсультах, лежит развитие нейровоспаления. Нейровоспаление при всех этих состояниях обусловлено длительной активацией клеток микроглии в ответ на повреждение, которая сопровождается секрецией активных метаболитов кислорода и азота и провоспалительных цитокинов [1]. Последние медиаторы активируют астроциты, которые также начинают секретировать провоспалительные цитокины, усиливая нейровоспаление и повреждение нейронов под действием этих факторов, что и приводит к нарушению когнитивных функций. Экзосомы нейральных стволовых/прогениторных клеток (НСК) и мезенхимные стромальные СК (МСК) обладают способностью стимулировать процессы регенерации многих тканей при разных типах повреждения, в том числе при действии излучения, благодаря содержанию таких регуляторных молекул, как микроРНК и факторы роста. В модели развития пострадиационного когнитивного снижения у мышей показана возможность его предупреждения при интраназальном введении экзосом НСК после облучения мозга [2].

Цель работы — характеристика биологической активности экзосом СК мыши и человека и накопления флуоресцентно меченных экзосом в культивируемых НСК и микроглии мыши линии SIM-A9 в сравнении с нейронами и астроцитами, дифференцированными из НСК *in vitro*, а также в клетках головного мозга мыши.

Линия НСК получена из клеток мозга мышат, МСК — из жировой ткани мышей (МСКм) C57Bl/6. МСК из жировой ткани человека (МСКч) приобретены в ООО «Покровском Банке стволовых клеток». Препараты экзосом выделяли из кондиционированной среды СК с помощью дифференциального ультрацентрифугирования и характеризовали по морфологии с помощью криогенной просвечивающей электронной микроскопии, по размеру с помощью метода динамического светорассеяния, по экспрессии антигенов CD9, CD63 и TSG101 с помощью проточной цитометрии, как описано ранее [3]. Концентрацию белка определяли с использованием набора ВСА. Показано, что по размеру, морфологии и присутствию специфических маркеров все препараты, полученные из разных СК, соответствовали экзосомам. НСК облучали в суспензии в культуральной среде на установке «ГУТ-200М» (кобальт-60) в дозе 1 Гр. К контрольным и облучённым НСК вносили экзосомы СК в концентрации 0,1 или 1 мкг белка/мл через 30 мин после облучения. Влияние экзосом НСК и МСК на выживаемость и клоногенную активность облучённых НСК оценивали через 72 ч и 7 сут после воздействия соответственно. Показано, что экзосомы НСК и МСКм и МСКч повышали выживаемость и клоногенную активность облучённых НСК. Гибель облучённых НСК происходила по механизму апоптоза, а их культивирование в присутствии экзосом интактных НСК и МСК снижало уровень апоптоза.

Исследовано влияние экзосом СК на скорость миграции нормальных (МСКм) и опухолевых клеток меланомы линии В16 и аденокарциномы молочной железы мыши линии Ca755 в модели с использованием метода «заращения раны», проведенной в субконфлуентной культуре клеток. Показано отсутствие влияния экзосом НСК и МСК на пролиферацию и скорость миграции МСК и опухолевых клеток мыши, что позволяет предполагать отсутствие стимуляции роста опухолей и миграции опухолевых клеток под действием экзосом СК.

Окрашивание экзосом НСК и МСК флуоресцентным красителем PKH26 проводили в соответствии с инструкцией производителя. При анализе локализации экзосом НСК и МСК в головном мозге мыши при проведении иммуногистохимического исследования препаратов головного мозга показано присутствие экзосом как в гиппокампе, так и в коре головного мозга. Культивируемые НСК и клетки микроглии линии SIM-A9 активно накапливали экзосомы в перинуклеарной области. Дифференцировку НСК проводили на стеклах, предварительно покрытых раствором Geltrex. Для индукции дифференцировки культуральную среду НСК заменяли средой Neurobasal A при постепенном удалении ЭФ и FGF, как описано ранее [4]. Через 6 суток дифференцировки (8 суток после посева на стекла) к дифференцированным в нейроны и астроциты клеткам добавляли флуоресцентно меченные красителем PKH26 экзосомы НСК и МСК (5 мкг/мл). Показано, что в дифференцированных из НСК нейронах и астроцитах мыши, экзосомы также обнаруживали в перинуклеарной области клеток, а в астроцитах также и в цитоплазме. В астроцитах экзосомы накапливались наиболее эффективно.

Таким образом, экзосомы НСК и МСКм и МСКч обладают способностью повышать выживаемость облучённых НСК, что может определяться переносом регуляторных и защитных факторов, т.к. показано их накопление в перинуклеарной области НСК, клеток микроглии, нейронов и астроцитов в экспериментах *in vitro*. Накопление экзосом СК мыши в коре и гиппокампе головного мозга мышей при интраназальном введении обеспечивает транспорт таких веществ через ГЭБ и обеспечивает сохранение когнитивных функций.

Работа проведена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Pazzaglia S., Briganti G., Mancuso M., et al. Neurocognitive decline following radiotherapy: mechanisms and therapeutic implications // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, N 1. P. 146. doi: 10.3390/cancers12010146
2. Ратушняк М.Г., Жирник А.С., Смирнова О.Д., и др. Использование препаратов экзосом нейральных стволовых клеток для предупреждения развития отдалённых пострадиационных когнитивных нарушений у мышей // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2022. № 4. С. 100–108. EDN: CRLYAI doi: 10.47056/1814-3490-2022-4-261-268
3. Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., Ястремский Е.В., и др. Повышение выживаемости облучённых нейральных стволовых клеток с помощью экзосом стволовых клеток // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2022. № 2. С. 261–268. EDN: JNUFVU doi: 10.47056/1814-3490-2022-2-100-108
4. Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., и др. Чувствительность культивируемых нейральных стволовых клеток мыши к действию ионизирующего излучения // *Цитология*. 2019. Т. 61, № 10. С. 806–816. doi: 10.1134/S0041377119100067

Ревокатова Д.П. ✉, Бикмулина П.Ю., Файзуллин А.Л., Христидис Я.И., Корнеев А.А.,
Косшелева Н.В., Шпичка А.И., Тимашев П.С.

Разработка биоэквивалента на основе внеклеточных везикул и сфероидов для восстановления незаживающих ран

Первый Московский государственный медицинский университет им. Сеченова, Институт регенеративной медицины,
Москва, Россия

✉ revokatova.d@gmail.com

Аннотация. Комбинированные биоэквиваленты, состоящие из гидрогеля, клеточных сфероидов и внеклеточных везикул, могут быть эффективными для лечения незаживающих ран. Они обеспечивают механическую поддержку, способствуют регенерации тканей и хорошо интегрируются в ткани донора, не вызывая иммунного ответа.

Ключевые слова: биоэквивалент; гидрогелевая система; кожа; внеклеточные везикулы; регенерация; незаживающие раны.

Revokatova D.P., Bikmulina P.Yu., Fayzullin A.L., Khristidis Ya.I., Korneev A.A., Kosheleva N.V.,
Shpichka A.I., Timashev P.S.

A bioequivalent based on extracellular vesicles and spheroids for wound healing

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. Combined bioequivalents consisting of hydrogel, cellular spheroids, and extracellular vesicles may be effective in treating non-healing wounds. These materials provide mechanical support, promote tissue regeneration, and integrate well into the body without eliciting an immune response.

Keywords: bioequivalent; bioink; hydrogel system; skin; extracellular vesicles; regeneration; non-healing wounds.

Незаживающие раны имеют широкое распространение и приводят к значительным финансовым затратам и снижению качества жизни. В качестве перспективного решения для терапии особое внимание уделяется созданию комбинированных биоэквивалентов на основе гидрогеля, клеточных сфероидов и внеклеточных везикул. В данной системе гидрогель обеспечивает механическую поддержку, сфероиды составляют клеточную основу конструкции, а внеклеточные везикулы обладают высоким прорегенеративным и противовоспалительным потенциалом. Исследование было сосредоточено на двух типах внеклеточных везикул — экзосомах и матрикс-связанных везикулах (МСВ) из мезенхимных стромальных клеток (МСК) как потенциальных агентах для созревания биоэквивалентов. Был использован гидрогель на основе фибрина и желатина в связи с его хорошо изученными свойствами и положительным влиянием на жизнеспособность клеток.

Мы не выявили различий в морфологических характеристиках экзосом и МСВ, тогда как сравнение протеомного профиля выявило, что экзосомы имеют более богатый белковый состав и в особенности экзосомы содержат больше белков, которые могут стимулировать созревание и интеграцию биоэквивалентов за счет увеличения миграции и стимуляции васкуляризации. Далее были получены комбинированные биоэквиваленты на основе сфероидов из МСК десны, фибробластов линии 977 hTERT, кератиноцитов HaCaT и смешанных сфероидов из фибробластов и кератиноцитов. Эксперименты *in vitro* показали, что экзосомы способствуют формированию более разветвленной и длинной сети отростков из сфероидов из МСК и фибробластов. Также было показано, что сфероиды из кератиноцитов в гидрогеле обладают сниженной жизнеспособностью, тогда

как их со-культивирование с фибробластами значительно способствует их выживаемости и дифференцировке, о чем свидетельствует синтез специфических маркеров, например цитокератина 19.

На основании экспериментов *in vivo* мы продемонстрировали, что фибриновый и фибрин-желатиновый гидрогель со сфероидами и без них, при подкожной имплантации мышам не вызывают иммунного ответа и хорошо интегрируются в окружающие ткани. При этом в биоэквивалентах со сфероидами мы наблюдали сниженное воспаление, а также лучшую резорбцию коллагеновой мембраны, которая используется для доставки имплантата в область повреждения.

Таким образом, комбинированные биоэквиваленты, состоящие из гидрогеля, клеточных сфероидов и внеклеточных везикул, могут быть эффективными для лечения незаживающих ран за счет обеспечения механической поддержки, стимуляции регенерации и интеграции в ткань пациента после имплантации. Данное исследование представляет собой первый шаг на пути создания комбинированных конструкций для лечения незаживающих ран и в целом открывает новые подходы к созданию биоэквивалентов.

Работа выполнена при поддержке программы стратегического академического лидерства «Приоритет-2030», на базе Сеченовского Университета.

Ремезова А.Н.¹, Орлова Н.В.¹ ✉, Муравьев А.Н.^{1,2}, Ариэль Б.М.¹, Виноградова Т.И.¹,
Юдинцева Н.М.³, Иванова Я.Г.¹, Горбунов А.И.¹

Экспериментальное применение мезенхимных клеток и внеклеточных везикул в комплексной терапии туберкулеза почки кролика

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский медико-социальный институт, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН), Санкт-Петербург, Россия

✉ nadinbat@gmail.com

Аннотация. Разработана модель туберкулезного поражения почки. Произведен анализ распределения внутриклеточных меток в организме животного после введения МСК. Применение МСК и внеклеточных везикул, выделенных из МСК, способствовало повышению эффективности лечения экспериментального нефротуберкулеза.

Ключевые слова: моделирование нефротуберкулеза; мезенхимные клетки; внеклеточные везикулы; туберкулез почки; клеточная терапия.

Remezova A.N.¹, Orlova N.V.¹, Muraviov A.N.^{1,2}, Ariel B.M.¹, Vinogradova T.I.¹, Yudintseva N.M.³,
Ivanova Ya.G.¹, Gorbunov A.I.¹

Experimental use of mesenchymal cells and extracellular vesicles in complex therapy of rabbit kidney tuberculosis

¹ Saint-Petersburg State Research Institute of Phthisiopulmonology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg Medico-Social Institute, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. A model of kidney tuberculosis was developed. The distribution of intracellular labels in the animal's body after the introduction of MSCs was analyzed. The use of MSCs and extracellular vesicles isolated from MSCs increased the effectiveness of treatment of experimental nephrotuberculosis.

Keywords: modeling of nephrotuberculosis; mesenchymal cells; extracellular vesicles; renal tuberculosis; cell therapy.

Доля туберкулезного поражения мочеполовой системы занимает одну из лидирующих позиций в структуре внелегочных форм данного заболевания [1]. Несмотря на высокую эффективность противотуберкулезных препаратов, развитие фиброзных изменений в мочевых путях в ряде случаев ведет к утрате функции органа (терминальной хронической почечной недостаточности) у 5,7% пациентов. В последние годы широко исследуется применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) и внеклеточных везикул в терапии туберкулеза различной локализации [2]. Применение таких клеток совместно со стандартной противотуберкулезной терапией подает большие надежды на сокращение продолжительности лечения, снижение активности специфического воспаления, а также на увеличение скорости репаративных процессов.

Цель выполненного исследования: обосновать возможность применения мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в комплексном лечении экспериментального туберкулеза почки.

Разработана и запатентована модель туберкулезного поражения почки, которая отличается от ранее предложенных малой травматичностью, постоянством воспроизведения, пригодна при решении вопросов

фтизиатрии и фтизиоурологии. После подтверждения развития туберкулезного процесса изучено биораспределение МСК, меченых суперпарамагнитными наночастицами оксида железа (SPIONs), после их однократного системного введения. Также зараженным животным ($n = 60$) начата противотуберкулезная терапия по стандартным режимам и в комбинации с системным однократным введением меченых МСК или микровезикул, содержащих секретом МСК.

При анализе распределения внутриклеточных меток в организме животного после однократного внутривенного введения меченых МСК получено представление о перемещении мезенхимных стволовых клеток *in vivo* в организме после заражения туберкулезом. Доказано, клетки сохраняют жизнеспособность и накапливаются в зоне специфического поражения почки.

По результатам исследования [3, 4] однократное системное применение мезенхимных стромальных клеток костного мозга через 1 месяц противотуберкулезной терапии у кроликов с туберкулезом почки, вызванного микобактериями с разной лекарственной чувствительностью, способствует повышению эффективности лечения. Отмечается снижение распространенности специфического воспаления в почках, уменьшение его активности и ускорение репаративной реакции с формированием зрелой соединительной ткани.

Однократное применение внеклеточных везикул, выделенных из мезенхимных стромальных клеток костного мозга, в составе химиотерапии моделированного туберкулеза почек приводила к значимому повышению уровня противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, сокращению распространенности туберкулезного процесса в тканях инфицированной почки и уменьшению его активности.

Полученная в результате проведенного исследования новая экспериментальная модель туберкулеза почки отличается от ранее предложенных малотравматичным хирургическим доступом, точной дозировкой микобактериальных клеток, используемых для заражения, доступностью для воспроизведения, возможностью персонифицированного прижизненного мониторинга патофизиологических изменений у экспериментальных животных, что позволяет использовать ее для разработки различных аспектов профилактики, диагностики и лечения данного заболевания в соответствии с задачами практической фтизиатрии и урологии. Данное экспериментальное исследование позволяет определить перспективы использования МСК и внеклеточных везикул во фтизиоурологии, а также позволяет анализировать показатели развития специфического воспалительного процесса в динамике.

Список литературы

1. Кульчавеня Е.В., Холтобин Д.Т. Динамика структуры туберкулеза почек за 20 лет // Терапевтический архив. 2022. Т. 94, № 1. С. 1239–1245. EDN: XFCRBU doi: 10.26442/00403660.2022.11.201930
2. Юдинцева Н.М., Шевцов М.А., Хотин М.Г., и др. Применение мезенхимных стволовых клеток и внеклеточных везикул в терапии инфекционных заболеваний // Молекулярная медицина. 2022. Т. 20, № 6. С. 16–24. EDN: ZNERWZ doi: 10.29296/24999490-2022-06-03
3. Muraviov A.N., Vinogradova T.I., Remezova A.N., et al. The use of mesenchymal stem cells in the complex treatment of kidney tuberculosis (experimental study) // Biomedicines. 2022. Vol. 10, N 12. P. 3062. EDN: DTEHBO doi: 10.3390/biomedicines10123062
4. Yudin N., Bobkov D., Sulatsky M., et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles for therapeutics of renal tuberculosis // Sci Rep. 2024. Vol. 14. P. 4495. doi: 10.1038/s41598-024-54992-z

Ржанова Л.А. ✉, Александрова М.А.

Стволовые клетки ретинального пигментного эпителия глаза человека и млекопитающих

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

✉ 9303923@gmail.com

Аннотация. Регенеративный потенциал тканеспецифичных стволовых клеток РПЭ млекопитающих и человека в регенерации РПЭ и сетчатки глаза, а также их роль в патогенезе и лечении нейродегенеративных заболеваний глаза.

Ключевые слова: РПЭ; РПЭСК; дифференцировка.

Rzhanova L.A., Aleksandrova M.A.

Stem cells of the retinal pigment epithelium of humans and mammals

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The regenerative potential of tissue-specific mammalian and human RPE stem cells in the regeneration of the RPE and retina, as well as their role in the pathogenesis and treatment of neurodegenerative eye diseases.

Keywords: RPE; RPESC; differentiation.

Необходимый для нормальной функции сетчатки ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) представляет собой слой однорядных, пигментированных, гексагональных клеток, расположенных между хориоидеей и фоторецепторами сетчатки глаза. Клетки РПЭ млекопитающих и человека являются терминально дифференцированными постмитотическими неделящимися клетками. Но есть данные о том, что у грызунов и макаков клетки РПЭ на периферии слоя способны к пролиферации. Клетки РПЭ можно активировать к делению при помещении в клеточную культуру. Предполагается, что пролиферация клеток РПЭ *in vitro* происходит за счет субпопуляции собственных стволовых клеток. В ряде работ из РПЭ человека были выделены немногочисленные клетки, которые, согласно строгому клональному анализу и другим критериям стволовых клеток (самообновление и производство дифференциального потомства), были отнесены к взрослым стволовым клеткам РПЭ (РПЭСК) [1]. Термин РПЭСК был впервые предложен Salero et al. после того, как они показали способность РПЭСК к мультипотентной дифференцировке: в нейральном и мезенхимном направлениях [2].

Исследования поведения клеток РПЭ от взрослого человека и от плода *in vitro* показали, что клетки в культуре дедифференцируются и экспрессируют маркеры стволовых и малодифференцированных клеток OCT4, NANOG, SOX2, PAX6, PROX1, SSEA-4, KLF4, C-MYC и LIN-28 [3].

В создаваемых *in vitro* условиях дифференцировки клетки РПЭ эмбрионального глаза и глаза взрослого человека, также мыши экспрессируют маркеры про- и нейральных клеток MS11, NES, TUBB3, GFAP, NF 68–200 kDa, TH, nNOS, CNPase, O4, Crx10, Opn3, Opn4, Nrl, Crx, Opn1mw/1w, Sag, Nr2e3 и рековерин [1, 4]. Таким образом, было показано, что в определённых условиях культивирования РПЭСК способны к дифференцировке в направлении нейральных предшественников переднего мозга и сетчатки.

Мезенхимальная дифференцировка клеток РПЭСК была показана экспрессией мезенхимальных стромальных маркеров CD133, CD73, CD105, CD90, остеогенных маркеров IBSP, RUNX2, RUNX3, хондрогенных маркеров COL2 α , ACAN и адипогенных маркеров ADPF, ADD1, PPAR γ [2, 3].

РПЭСК мышей и человека способны редифференцироваться к исходному фенотипу. Монослойные культуры клеток РПЭ, полученные из РПЭСК (РПЭСК-РПЭ) человека, были описаны и охарактеризованы как культуры с морфологией и физиологией, характерными для нативного РПЭ [5].

Все представленные данные, подтвержденные полногеномным и одноклеточным секвенированием ДНК и РНК, указывают на то, что РПЭСК обладают широким спектром дифференцировок. Интересно, что эти процессы более напоминают дифференцировку клеток нервного гребня, а не клеток нервной трубки, из которой РПЭ происходит.

На животных моделях была продемонстрирована успешная трансплантация РПЭСК плода человека, где клетки дифференцировались как в РПЭ, так и в фоторецепторы [2, 4]. На сегодняшний день РПЭСК-РПЭ человека рассматривают как потенциально неограниченный источник донорских HLA-совместимых клеток с определенными качествами благоприятными для пересадки, включая стабильность, повсеместность и стоимость [1].

Список литературы

1. Rzhanova L.A., Markitantova Y.V., Aleksandrova M.A. Recent achievements in the heterogeneity of mammalian and human retinal pigment epithelium: in search of a stem cell // *Cells*. 2024. Vol. 13, N 3. P. 281. doi: 10.3390/cells13030281
2. Salero E., Blenkinsop T.A., Corneo B., et al. Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives // *Cell Stem Cell*. 2012. Vol. 10, N 1. P. 88–95. doi: 10.1016/j.stem.2011.11.018
3. Shen H., Ding C., Yuan S., et al. Vitamin C- and valproic acid-induced fetal rpe stem-like cells recover retinal degeneration via regulating SOX2 // *Mol Ther*. 2020. Vol. 28, N 7. P. 1645–1657. doi: 10.1016/j.jymthe.2020.04.008
4. Chen F., Liu X., Chen Y., et al. Sphere-induced reprogramming of RPE cells into dual-potential RPE stem-like cells // *EBioMedicine*. 2020. Vol. 52. doi: 10.1016/J.EBIOM.2019.102618
5. Fernandes M., McArdle B., Schiff L., et al. Stem cell-derived retinal pigment epithelial layer model from adult human globes donated for corneal transplants // *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2018. Vol. 45, N 1. doi: 10.1002/CPSC.53

Ржепаковский И.В. ✉, Писков С.И., Аванесян С.С., Сизоненко М.Н., Кочергин С.Г., Тимченко Л.Д.

Биосовместимость 3D-скаффолдов на основе различных полисахаридов

Северо-Кавказский федеральный университет, Ставрополь, Россия

✉ 78igorr@mail.ru

Аннотация. Бактериальная целлюлоза (БЦ) использована для формирования 3D-скаффолдов с включением различных полисахаридов. Скаффолд БЦ + метилцеллюлоза показал наибольшую влагоемкость — 4280%, низкий удельный вес — 0,15 г/см³, а также самый высокий уровень биосовместимости на модели хориоаллантаоисной оболочки куриного эмбриона.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза; скаффолд; тканевая инженерия; биосовместимость; модель хориоаллантаоисной оболочки; микро-КТ.

Rzhepakovsky I.V., Piskov S.I., Avanesyan S.S., Sizonenko M.N., Kochergin S.G., Timchenko L.D.

Biocompatibility of 3D scaffolds based on various polysaccharides

North-Caucasus Federal University, Stavropol, Russia

Abstract. Bacterial cellulose (BC) was used to form 3D scaffolds incorporating various polysaccharides. The BC + methylcellulose scaffold showed the highest moisture capacity — 4280%, low specific gravity — 0.15 g/cm³, and also the highest level of biocompatibility in the model of the chick embryo chorioallantoic membrane.

Keywords: bacterial cellulose; scaffold; tissue engineering; biocompatibility; chorioallantoic membrane assay; microCT.

В настоящее время продолжается активный поиск новых источников биоматериалов, а также совершенствование технологий получения 3D-скаффолдов на их основе. Важными аспектами при этом является высокий уровень биосовместимости. При этом все больше внимание обращается в сторону бактериальной целлюлозы (БЦ), которая обладает рядом преимуществ. БЦ — термически устойчива, обладает высоким уровнем химической чистоты, прочностью, эластичностью, газопроницаемостью, высокой влагоемкостью и способностью усиливать процессы регенерации животных тканей. Кроме этого, при некоторых условиях есть потребность в небioresлагаемых, но биосовместимых скаффолдах для тканевой инженерии [1]. Ранее проведенные нами исследования показали, что при всех преимуществах формирование 3D-скаффолдов на основе БЦ требует совершенствования технологии за счет внесения дополнительных компонентов. Это связано с необходимостью равномерного распределения волокон целлюлозы и формирования объемных структур, напоминающих животные ткани [2]. В данном исследовании была поставлена задача изучить влияние различных полисахаридов на формирование структуры и биосовместимость 3D-скаффолдов на основе БЦ, полученной при выращивании симбиотического сообщества микроорганизмов *Medusomyces gisevii* Sa-28. Очищенная и стерилизованная бактериальная целлюлоза была использована в технологическом процессе формирования 3D-скаффолдов, при включении различных полисахаридов (каррагинан, метилцеллюлоза, пектин, хитозан) в количестве 10% к массе БЦ. По большинству физических показателей скаффолды с включением каррагинана, пектина, хитозана не имели статистически значимых отличий от чистой БЦ. Скаффолд БЦ + метилцеллюлоза показал наибольшую влагоемкость $4280 \pm 140\%$ (на 22,3% больше, чем чистая БЦ) и низкий удельный вес $0,15 \pm 0,1$ г/см³ (на 42,3% меньше, чем чистая БЦ). Это было связано с формированием за счет метилцеллюлозы наравне с общей крупной пористостью более мелких структур и увеличением общего объема скаффолда. Данные результаты были подтверждены макроскопическим

анализом полученных 3D-скаффолдов. Скаффолд БЦ + хитозан был максимально приближен по структуре к контрольному образцу БЦ и характеризовался неравномерной крупнопористой структурой. БЦ + пектин отличался низкой пористостью на поверхности скаффолда и неодинаковой пористостью по слоям. БЦ + каррагинан характеризовался низкой пористостью и ее очаговой неравномерностью на поверхности скаффолда. Скаффолд БЦ + метилцеллюлоза выделялся наличием мелкопористых очагов и большей толщиной скаффолда. Биосовместимость и сосудистые эффекты полученных 3D-скаффолдов оценивали на модели хориоаллантоисной оболочки куриного эмбриона (ХАО) и подвергали микро-КТ анализу [3, 4]. Имплантация всех изучаемых образцов на ХАО сопровождалась формированием сосудистого паттерна в виде сходящихся к скаффолду сосудов. Наблюдался наплыв тканей ХАО на края скаффолдов. Данные факты, как критерии положительной биосовместимости, в порядке увеличения их выраженности по образцам распределились следующим образом: БЦ + хитозан < БЦ + каррагинан < БЦ + пектин < БЦ < БЦ + метилцеллюлоза. Оценку инфильтрации кровеносных сосудов проводили макроскопическим методом на стороне аллантоисного эпителия ХАО. По бальной системе (5 баллов — выраженный ангиогенный эффект) лидирующую позицию занимали скаффолды с добавлением метилцеллюлозы ($3,9 \pm 0,5$) и скаффолды на основе чистой БЦ ($3,7 \pm 0,4$). По данным микро-КТ сосуды ХАО прорастали внутрь скаффолдов. Образцы БЦ с добавлением пектина ($3,4 \pm 0,4$), хитозана ($3,1 \pm 0,3$) и каррагинана ($2,9 \pm 0,2$) также имели положительный ангиогенный эффект, однако по данным микро-КТ развитие новых сосудов визуализировалось в основном по периферии скаффолдов. Таким образом, метилцеллюлоза в качестве дополнительного компонента 3D-скаффолдов на основе БЦ показала преимущество перед другими полисахаридами и имеет перспективы для применения.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-24-00282, <https://rscf.ru/project/23-24-00282/> (дата обращения: 25.07.2024).

Список литературы

1. Petrova V.A., Gofman I.V., Golovkin A.S., et al. Bacterial cellulose composites with polysaccharides filled with nanosized cerium oxide: characterization and cytocompatibility assessment // *Polymers (Basel)*. 2022. Vol. 14, N 22. P. 5001. doi: 10.3390/polym14225001
2. Rzhepakovsky I., Piskov S., Avanesyan S., et al. Composite of bacterial cellulose and gelatin: a versatile biocompatible scaffold for tissue engineering // *Int J Biol Macromol*. 2024. Vol. 256, Pt. 1. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2023.128369
3. Ribatti D., Annese T., Tamma R. The use of the chick embryo CAM assay in the study of angiogenic activity of biomaterials // *Microvasc Res*. 2020. Vol. 131. doi: 10.1016/j.mvr.2020.104026
4. Rzhepakovsky I., Piskov S., Avanesyan S., et al. High-performance microcomputing tomography of chick embryo in the early stages of embryogenesis // *Appl Sci*. 2023. Vol. 13. doi: 10.3390/app131910642

Ризванов А.А. ✉, Муллагулова А.И., Шаймарданова А.А.,
Соловьева В.В., Мухамедшина Я.О.

Генная терапия лизосомных болезней накопления

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ rizvanov@gmail.com

Аннотация. Генная терапия лизосомных болезней накопления на примере метахроматической лейкодистрофии с помощью аденоассоциированного вируса, кодирующего кодон-оптимизированную последовательность гена ARSA человека.

Ключевые слова: генная терапия; лизосомные болезни накопления; метахроматическая лейкодистрофия; аденоассоциированный вирус; наследственные заболевания; орфанные заболевания; нейродегенеративные заболевания; арилсульфатаза А.

Rizvanov A.A., Mullagulova A.I., Shaymardanova A.A.,
Solovyova V.V., Mukhamedshina Ya.O.

Gene therapy of lysosomal accumulation diseases

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Gene therapy of lysosomal accumulation diseases on the example of metachromatic leukodystrophy using adeno-associated virus encoding codon-optimized sequence of human ARSA gene.

Keywords: gene therapy; lysosomal storage diseases; metachromatic leukodystrophy; adeno-associated virus; hereditary diseases; orphan diseases; neurodegenerative diseases; arylsulfatase A.

Лизосомные болезни накопления представляют собой группу заболеваний, вызванных мутациями в генах ферментов, ответственных за деградацию макромолекул и транспорт липидов. 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 данной работы — разработать метод генной терапии МЛД с использованием рекомбинантного аденоассоциированного вируса серотипа 9 (AAV9), кодирующего ген ARSA человека. В данной работе был получен AAV9-ARSA, кодирующий кодон-оптимизированную последовательность гена ARSA человека. Полученный AAV9-ARSA вводили интратекально и внутривенно минипигам. Динамическую активность фермента ARSA анализировали в спинномозговой жидкости (СМЖ) и образцах плазмы с помощью рNCS (#N7251, SIGMA). Органы центральной нервной системы (ЦНС) использовались для анализа ферментативной активности, экспрессии гена ARSA и иммуногистохимического анализа. Безопасность оценивали по биохимическим, патогистологическим показателям и анализу цитокинового профиля.

Обнаружено повышение активности фермента ARSA в СМЖ минипигов после интратекального введения. После внутривенного введения активность фермента повысилась в мозжечке, отделах спинного мозга. При внутривенном введении была обнаружена мРНК гена ARSA и клетки сверхэкспрессирующие ARSA в мозжечке, грудном отделе спинного мозга и ганглиях задних корешков. При интратекальном введении выявлена мРНК кодон-оптимизированного гена ARSA и обнаружены клетки со сверхэкспрессией ARSA в мозжечке, отделах спинного мозга. Изменений в биохимических показателях и цитокиновом профиле

не обнаружено. Патоморфологический анализ не выявил каких-либо отклонений в органах. В данной работе показано, что интратекальное введение AAV9-ARSA приводит к сверхэкспрессии в ЦНС, внутривенное введение — в ЦНС и ПНС.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Проект № FZSM-2023-0011.

Риппинен Д.В. ✉, Соловьева А.О.

Скрининг чувствительности фибробластоподобных синовиоцитов, полученных от больных ревматоидным артритом, к ФНО-А как основному игроку в патогенезе

НИИКЭЛ — филиал ИЦИГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ d.rippinen@g.nsu.ru

Аннотация. В работе проведена сравнительная характеристика линий фибробластоподобных синовиоцитов, выделенных от пациентов с ревматоидным артритом. Проанализирована скорость их миграции, секреция цитокинов, ответ на воздействие провоспалительных цитокинов.

Ключевые слова: ревматоидный артрит; клеточная модель; фибробластоподобные синовиоциты; цитокины; базовая секреция; патогенез; терапия; синовиальная оболочка; синовиальная жидкость.

Rippinen D.V., Solovieva A.O.

Screening of sensitivity of fibroblast-like synoviocytes obtained from rheumatoid arthritis patients to TNF- α as a major player in pathogenesis

NIICEL — branch of ICIG SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. In this work we have carried out a comparative characterization of fibroblast-like synoviocyte lines isolated from patients with rheumatoid arthritis. Their migration rate, cytokine secretion, and response to proinflammatory cytokines were analyzed.

Keywords: rheumatoid arthritis; cell model; fibroblast-like synoviocytes; cytokines; basic secretion; pathogenesis; therapy; synovial membrane; synovial fluid.

Разработка лекарственных препаратов, особенно для сложных и комплексных иммунопатологических заболеваний, является крайне трудоёмкой, поэтому необходима качественная оценка их эффективности на ранних этапах разработки. Анализ эффективности во многом зависит от используемой *in vitro* тест-системы, поэтому подбор модели, отражающей патогенетические механизмы целевой патологии, является важным этапом разработки лекарственных препаратов. Ревматоидный артрит (РА) включает сложную сеть взаимодействия различных цитокинов и клеточных элементов, которые запускают воспалительную клеточную инфильтрацию, синовиальную гиперплазию, повреждение хряща и разрушение костной ткани [4]. Основными игроками патогенеза РА признаны: ФНО- α и IL-6. Помимо цитокинов в патогенезе РА ведущую роль играют фибробластоподобные синовиоциты (ФПС), характеризующиеся эпигенетически импринтированным агрессивным ростом, продукцией провоспалительных цитокинов, включая IL-6, ФНО- α и MMPs, агреканазы, молекул адгезии [1, 2, 3]. Таким образом, ФПС являются главной мишенью при терапии данного заболевания. Поэтому они являются прекрасными претендентами для основы *in vitro* скрининговых тест-систем в фармакологии.

Лечение РА в основном связано с использованием модифицирующего заболевание противоревматических антицитокиновых препаратов на основе моноклональных антител (МАТ). Несмотря на большое разнообразие существующих препаратов, активно продолжается поиск эффективных агентов, причём помимо антител ведутся разработки таргетных препаратов на основе ДНК и РНК аптамеров. Данная работа является частью исследования эффективности аптамеров против ФНО- α как перспективного антиревматического препарата,

поэтому основной упор делается на анализ реактивности ФПС на фактор некроза опухоли в виде повышения пролиферативной и миграционной активности, а также секреции IL-6.

Источниками фибробластоподобных синовиоцитов могут служить синовиальная оболочка (СО) и синовиальная жидкость (СЖ) коленного сустава пациентов с диагнозом РА. В качестве контроля использовался биоматериал от пациентов без РА (все исследования получили одобрение локального этического комитета, все манипуляции проводили после получения добровольного информированного согласия пациентов).

Первым этапом был проанализирован иммунофенотип выделенных клеток при помощи проточной цитометрии. В результате было продемонстрировано, что 98% клеток характеризовались иммунофенотипом: CD45⁺44⁺73⁺90⁺. Далее была определена базовая секреция ФНО- α клеточными линиями иммуноферментным методом. Было продемонстрировано, что фибробластоподобные синовиоциты секретируют ФНО- α на статистически более высоком уровне по сравнению с контрольной культурой фибробластов (линия MRC-5). При этом наличие ревматоидного артрита не влияло на уровень секреции. Так, секреция ФНО- α клетками, полученными от пациентов с ревматоидным артритом, была на уровне $0,18 \pm 0,01$ пг/мл, без ревматоидного артрита $0,2 \pm 0,01$ пг/мл, а линия MRC-5 имела значения секретируемого ФНО $0,04$ пг/мл.

При стимулировании исследуемых клеточных линий экзогенным ФНО- α регистрировалось планомерное значимое повышение IL-6 в течение 48 часов ($8,4$ пг/мл — базовая секреция, до $447,3$ пг/мл стимулированная). При этом обработка клеток препаратом Симзия (фрагмент моноклонального антитела, ингибитор ФНО) приводило к снижению последней. Однако в ходе исследования было обнаружено, что не все ФПС от больных ревматоидным артритом секретируют IL-6. В частности, клеточные линии с низким исходным уровнем секреции не отвечали на стимуляцию ФНО- α .

Таким образом, в процессе исследования базовой и индуцируемой секреции IL-6 фибробластоподобными синовиоцитами было установлено, что уровень базовой секреции цитокинов варьирует среди различных клеточных линий. Таким образом, при тестировании разрабатываемых анти ФНО- α препаратов (МАТ, аптамеры) необходимо предварительно оценивать базовую чувствительность клеток к ФНО- α и, соответственно, к любым целевым цитокинам.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, номер темы № FWNR-2022-0009.

Список литературы

1. Jiang H., Zhang Z., Yu Y., et al. Drug discovery of DKK1 Inhibitors // *Front Pharmacol.* 2022 Vol. 13. doi: 10.3389/fphar.2022.847387
2. Niu, Yuting Aptamer-immobilized bone-targeting nanoparticles in situ reduce sclerostin for osteoporosis treatment // *Nanotoday.* 2022. Vol. 45. doi: 10.1016/j.nantod.2022.101529
3. Pap T., Korb-Pap A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis—two unequal siblings // *Nat Rev Rheumatol.* 2023. Vol. 11, N 10. P. 606–615. doi: 10.1038/s41536-023-00333-z
4. Sobh M.M., Abdalbary M., Elnagar S., et al. Secondary osteoporosis and metabolic bone diseases // *J Clin Med.* 2022. Vol. 11, N 9. doi: 10.3390/jcm11092382

Риппинен Д.В., Соловьева И.М., Овчинников В.С., Ярославцев Д.В., Соловьева А.О. ✉

Нетканые материалы с антибактериальными свойствами на основе поликапролактона

НИИКЭЛ-филиал ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ solovevaao@yandex.ru

Аннотация. Работа посвящена разработке антибактериальных материалов для терапии ран с антибиотикоустойчивой флорой. Была продемонстрирована высокая антибактериальная активность, низкая цитотоксичность, равномерное пролонгированное время выхода антибактериального агента в среду.

Ключевые слова: поликапролактон; антибактериальный пептидомиметик; терапия инфицированных ран.

Ripinen D.V., Soloveva I.M., Ovchinnikov V.S., Yaroslavtsev D.V., Soloveva A.O.

Non-woven materials with antibacterial properties based on polycaprolactone

Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology — Branch of IC&G SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. The work is devoted to the development of antibacterial materials for the treatment of wounds with antibiotic-resistant flora. High antibacterial activity, low cytotoxicity, uniform prolonged time of release of the antibacterial agent into the environment were demonstrated.

Keywords: polycaprolactone; antibacterial peptidomimetic; therapy of infected wounds.

Устойчивость к антибиотикам представляет собой серьезный вызов для современного общества и мирового здравоохранения. Короткие антимикробные пептиды (АМП), за счет своей высокой активности и отсутствия специфических механизмов защиты у бактерий, имеют потенциал в качестве альтернативных антибактериальных агентов. На сегодняшний день идентифицировано более 3000 АМП, но только часть из них одобрены для клинических испытаний. Их клиническое применение ограничено системной токсичностью, восприимчивостью к деградации протеазами, коротким периодом полураспада и быстрым почечным клиренсом. Эти ограничения являются основными препятствиями для успеха АМП в качестве коммерческих лекарств.

Иммобилизация на/в наноматериалы — один из перспективных подходов для их доставки. В качестве доставки пептидов в материалы используются различные подходы, в том числе совместное электроформование пептидов с полимерами синтетической и натуральной природы. Однако за счет их маленьких размеров АМП быстро элиминируются из волокон (в течение 60 мин выходит 85%) [1]. Поликапролактон является биodeградируемым синтетическим полимером, отличается низкой токсичностью, одобрен Управлением по контролю за продуктами и лекарствами, активно применяется в медицине.

В данной работе используется синтетический антимикробный пептидомиметик (LTX-109), полученный методом синтеза пептидов в растворе, отличающийся устойчивостью к протеолитическому расщеплению за счет малых размеров молекулы: всего 0,8 кДа по сравнению, например, с дефензинами (2–6 кДа), и присутствием модифицированного триптофана и концевой фенэтильной группы. Пептидомиметик вводили в состав волокон при совместном электроформовании при отработанных режимах. Сложность эффективной интеграции в наноматериалы антибактериальных пептидов — быстрая скорость их выхода. В нашем исследовании мы продемонстрировали сохранение пептидов в составе нановолокон в течение 2 недель непрерывного вымачивания (вышло всего 20% пептида), при сохранении высокой антибактериальной активности после

длительного вымачивания в физиологической жидкости (продемонстрированная на *E. coli* ATCC25922, *S. aureus* ATCC25923, *S. Typhimurium* ATCC14028, *P. aeruginosa* ATCC27853, *Candida albicans*).

Помимо этого, была продемонстрирована низкая токсичность полученных материалов на клетки, культивированных на их поверхности, оцененные при помощи флуоресцентного микроскопа и окрашивании клеток ДНК интеркалирующими красителями Hoechst и пропидий йодид. Что позволяет оценить общее количество клеток и их жизнеспособность. В результате было показано, что количество клеток не отличается значимо между PCL-ref (исходный материал, состоящий только из поликапролактона) и PCL- LTX-109 (с концентрациями пептидомиметика в материале от 0,125 до 1%).

Таким образом, было показано, что композиционные материалы, полученные методом электроформования на основе поликапролактона и содержащие в своем составе антибактериальный пептидомиметик в различных концентрациях, имеют продолжительную высокую антибактериальную активность, при низкой цитотоксичности.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ, номер темы FWNR-2022-0009.

Список литературы

1. Eriksen T.H.B., Skovsen E., Fojan P. Release of antimicrobial peptides from electrospun nanofibres as a drug delivery system // J Biomed Nanotechnol. 2013. Vol. 9, N 3. P. 492–498. doi: 10.1166/jbn.2013.1553

Роговая О.С. ✉, Черкашина О.Л., Аболин Д.С., Воротеляк Е.А., Калабушева Е.П.

Оценка антифибротических свойств вертепорфина в составе коллагенового носителя в модельной ране

ИБР РАН, Москва, Россия

✉ rogovaya26f@ya.ru

Аннотация. Серьезные повреждения кожи требуют специализированной терапии, стимулирующей регенерацию и предотвращающей образование рубцов. Мы исследовали комбинацию коллагенового геля и вертепорфина (ВП) для улучшения заживления. В сочетании с коллагеном ВП потерял способность предотвращать рубцевание, вероятно, из-за несовместимых механизмов действия.

Ключевые слова: регенерация кожи; фиброз; вертепорфин; YAP/TAZ.

Rogovaya O.S., Cherkashina O.L., Abolin D.S., Vorotelyak E.A., Kalabusheva E.P.

Evaluation of antifibrotic properties of verteporfin in a composition of a collagen scaffold in a model wound

Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Serious skin damage requires specialized therapy to stimulate regeneration and prevent scarring. We investigated the combination of collagen gel and verteporfin (VP) to improve healing. When combined with collagen, VP lost its ability to prevent scarring, likely due to incompatible mechanisms of action.

Keywords: fibrosis; skin regeneration; verteporfin; YAP/TAZ.

Разработка тканеинженерных конструкций, стимулирующих процессы ранозаживления, но не приводящих к появлению рубцов, актуальна для пациентов с ожоговыми поражениями кожи и при других патологиях. Вертепорфин (ВП) — один из наиболее перспективных противофибротических препаратов, поэтому рассматривается возможность добавления его в состав коллагеновых препаратов, стимулирующих процессы регенерации [1, 2]. Эксперименты проводили на мышах C57Bl6 в модели шинированной раны. ВП вносили в рану в составе коллагенового геля или в растворе на ранних этапах ранозаживления. Полное закрытие ран происходило на 14-е сутки и практически не отличалось в контрольных и экспериментальных группах. Выраженные отличия в степени закрытия ран наблюдали на 7-й день после операции. Раны, заживающие в присутствии коллагенового геля (группы «Гель» и «Гель + ВП»), в течение первой недели закрывались медленнее по сравнению с группами без геля («Контроль» и «ВП»). ВП сам по себе не влиял на скорость закрытия ран, но при гистологическом исследовании криосрезов кожи на 22-е сутки показано уменьшение толщины дермы, а при иммунофлуоресцентном анализе ран выявили уменьшение содержания коллагенов I + III в группе «ВП», что свидетельствует об антифибротическом влиянии ВП, внесенного в раны в растворе. Несмотря на свойство ВП ингибировать сигнальный каскад YAP1 [2, 3], активная ядерная форма этого белка была выявлена в одинаковой степени во всех образцах в дерме, а также в части клеток базального слоя эпидермиса независимо от присутствия ВП, что указывает на восстановление активности данного каскада. Для анализа состояния регенерирующей дермы на 22-й послеоперационный день проводили анализ коллагеновых волокон в гистологических препаратах кожных ран при помощи алгоритмов CT-FIRE и CurveAlign. Значительных различий в морфологии коллагена между группами «Контроль» и «ВП» после оценки всех параметров выявлено не было. Как среди образцов группы «Контроль», так и среди образцов из группы «ВП» присутствовали более выпрямленные длинные волокна, которые могут быть

характерны для фиброзной стадии нормального раневого заживления [4]. При внесении ВП в составе коллагенового геля (группа «Гель + ВП») наблюдали увеличение ширины, длины, выпрямленности и степени выравнивания коллагеновых волокон по сравнению с ранами, куда вносили просто коллагеновый гель, что может свидетельствовать о большей степени фибротических изменений в дерме. При совмещении четырех групп в общем пространстве главных компонент группы «Контроль», «ВП» и «Гель» практически не разделяются, при этом группа «Гель + ВП» наиболее отклоняется от остальных. Таким образом, несмотря на положительный эффект от добавления ВП, его сочетание с коллагеновым гелем патологически сказывалось на процессах регенерации. Таким образом, исследованный нами вариант внесения ВП в область раны не позволяет ускорить регенерацию, а значит, возможные носители ВП для терапии ранозаживления требуют дальнейшего изучения.

Работа поддержана грантом РФФ 21-74-30015.

Список литературы

1. Mascharak S., Talbott H.E., Januszzyk M., et al. Multi-Omic analysis reveals divergent molecular events in scarring and regenerative wound healing // *Cell Stem Cell*. 2022. Vol. 29, N 2. P. 315–327. doi: 10.1016/j.stem.2021.12.011
2. Shi-wen X., Racanelli M., Ali A., et al. Verteporfin inhibits the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma dermal fibroblasts // *J Cell Commun Signal*. 2021. Vol. 15, N 1. P. 71–80, doi: 10.1007/s12079-020-00596-x
3. Wang C., Zhu X., Feng W., et al. Verteporfin inhibits YAP function through up-regulating 14-3-3 σ sequestering YAP in the cytoplasm // *Am J Cancer Res*. 2016. Vol. 6, N 1. P. 27–37.
4. El Ayadi A., Jay J.W., Prasai A. Current approaches targeting the wound healing phases to attenuate fibrosis and scarring // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 3. P. 1105. doi: 10.3390/ijms21031105

Родимова С.А.¹✉, Елагин В.В.¹, Можеров А.М.^{1,2}, Щечкин И.Д.¹, Крылов Д.П.^{1,2}, Козлов Д.С.^{1,2},
Гаврина А.И.¹, Бобров Н.В.^{1,3}, Загайнов В.Е.^{1,4}, Загайнова Е.В.^{1,5}, Кузнецова Д.С.^{1,2}

Новые оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при патологии

¹ Приволжский исследовательский медицинский университет, Нижний Новгород, Россия

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

³ Приволжский окружной медицинский центр, Нижний Новгород, Россия

⁴ ГАУЗ НО НИИКО «Нижегородский областной клинический онкологический диспансер», Нижний Новгород, Россия

⁵ ФНКЦ Физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА, Москва, Россия

✉ srodimova123@gmail.com

Аннотация. Были выявлены новые оптические признаки снижения регенераторного потенциала печени при стеатозе и фиброзе с применением мультифотонной микроскопии, генерации второй оптической гармоники и FLIM микроскопии для экспресс-интраоперационной оценки состояния печени при сопутствующей патологии.

Ключевые слова: мультифотонная микроскопия; FLIM; регенерация печени; стеатоз; фиброз.

Rodimova S.A.¹, Elagin V.V.¹, Mozherov A.M.^{1,2}, Shchekhin I.D.¹, Krylov D.P.^{1,2}, Kozlov D.S.^{1,2}, Karabut M.M.¹,
Gavrina A.I.¹, Bobrov N.V.^{1,3}, Zagaynov V.E.^{1,4}, Zagaynova E.V.^{1,5}, Kuznetsova D.S.^{1,2}

Novel optical criteria of violated regenerative potential of the liver with pathology

¹ Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

³ The Volga District Medical Centre of Federal Medical and Biological Agency, Nizhny Novgorod, Russia

⁴ Nizhny Novgorod Regional Clinical Oncologic Dispensary, Nizhny Novgorod, Russia

⁵ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Using multiphoton microscopy, second harmonic generation and FLIM microscopy we identified novel optical criteria of a decrease in the regenerative potential of the liver in steatosis and fibrosis for express intraoperative assessment of the liver with concomitant pathology.

Keywords: multiphoton microscopy; FLIM; liver regeneration; steatosis; fibrosis.

Резекция печени остается наиболее эффективным методом лечения опухолей, локализованных в печени [1]. Однако при наличии печеночной патологии регенеративный потенциал существенно снижается [2]. Современные клинические методы недостаточно эффективны для прогнозирования эффективности регенерации печени, а также для экспресс-оценки наличия патологии. Современные бесконтрастные методы мультифотонной микроскопии, генерацией второй гармоники (ГВГ) и время-разрешенным имиджингом (FLIM) позволят выявить новые оптические признаки снижения регенеративного потенциала печени при сопутствующей печеночной патологии даже интраоперационно.

Эксперименты проводили на крысах линии Wistar. Фиброз печени индуцировали путем введения CCl₄, стеатоз индуцировали с применением диеты с 60% содержанием жиров. На разных стадиях патологии индуцировали регенерацию путем 70% гепатэктомии (ГЭ). С применением мультифотонной микроскопии оценивали структуру ткани печени на 3-й и 7-й день регенерации и определили интенсивность флуоресценции

НАД(Ф)Н в зонах низкого и высокого сигнала. С применением FLIM анализировали вклады времен жизни флуоресценции свободной и связанной формы НАДН (а2, %) и НАДФН (а3, %). Для верификации проводили стандартный морфологический анализ и стандартный биохимический анализ крови.

В результате были выявлены характерные оптические признаки состояния печени на разных этапах регенерации при стеатозе и фиброзе. При стеатозе были выявлены зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, ассоциированные с зонами липидной инфильтрации и единичными очагами фиброза. При фиброзе также наблюдали зоны со сниженным сигналом флуоресценции НАД(Ф)Н, ассоциированные с многочисленными фиброзными септами. Площадь зон со сниженной интенсивностью флуоресценции НАД(Ф)Н увеличивалась по мере развития патологии. Методом FLIM показано отсутствие резкого увеличения значений а2 и а3, что не соответствует условиям успешной регенерации. Выявленные оптические признаки могут быть транслированы в медицину в связи с возможностью приборной реализации методов мультифотонной микроскопии в клинике.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-15-00421.

Список литературы

1. Ramos E., Torras J., Lladó L., et al. The influence of steatosis on the short-and long-term results of resection of liver metastases from colorectal carcinoma // *HPB (Oxford)*. 2016. Vol. 18, N 4. P. 389–396. doi: 10.1016/j.hpb.2015.12.002
2. De Meijer V.E., Kalish B.T., Puder M., et al. Systematic review and meta-analysis of steatosis as a risk factor in major hepatic resection // *Br J Surg*. 2010. Vol. 97, N 9. P. 1331–1339. doi: 10.1002/bjs.7194

Романишин А.О.¹ ✉, Васильев А.А.¹, Хасаншин Э.М.², Евтехов А.А.², Какоткин В.В.¹,
Агапов М.А.¹, Семина Е.В.^{1,3}

Онколитические вирусы как новый подход терапии глиом

¹ Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

² ГБУЗ КО «Калининградская областная клиническая больница», Калининград, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ romanishin.alexander97@yandex.ru

Аннотация. Онколитические вирусы рассматриваются как один из перспективных подходов для терапии глиом. В основе используемого метода применяется система тимидинкиназа — ганцикловир, которая позволяет специфично воздействовать на опухолевые клетки, оказывая минимальное влияние на здоровые, окружающие опухоль ткани.

Ключевые слова: глиомы; онколитические вирусы; темозоломид; IDH1; тимидинкиназа; ганцикловир.

Romanishin A.O.¹, Vasilev A.A.¹, Khasanshin E.M.², Evtekhov A.A.², Malaschenko V.V.¹,
Kakotkin V.V.¹, Agapov M.A.¹, Semina E.V.^{1,3}

Oncolytic viruses is a novel approach for glioma therapy based on induction of apoptosis

¹ Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

² Regional Clinic Hospital, Kaliningrad, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Oncolytic viruses are a promising approach for glioma therapy. At its core lies the thymidine kinase and ganciclovir system, which could induce apoptosis. TK-GCV system allows for specific tumor cells targeting, leaving healthy cells unaffected.

Keywords: glioma; oncolytic viruses; temozolomide; IDH1; thymidine kinase; ganciclovir.

Глиомы являются одними из самых распространенных и гетерогенных новообразований центральной нервной системы. Для лечения глиом существует единый «золотой стандарт» терапии, включающий в себя хирургическую резекцию опухоли, химиотерапию (Темозоломид (ТМЗ), Ломустин, Цисплатин) и радиотерапию. Одной из ключевых особенностей глиом является необходимость применения генетического анализа для точной диагностики в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Наиболее злокачественными являются глиомы 3-й степени (астроцитомы, олигоастроцитомы и олигодендроглиомы) и 4-й степени (глиобластомы). Клинически значимой мутацией в контексте патогенеза и прогноза является R132H вариант гена изоцитратдегидрогеназы 1 (*IDH1*), при котором повышается чувствительность к ТМЗ и улучшаются шансы положительного исхода для пациента. Дикий вариант гена *IDH1*, наоборот, снижает эффективность терапии. Несмотря на «золотой стандарт» и использование генетического анализа, медиана выживаемости пациентов составляет 36 мес для пациентов с глиомой 3-й степени злокачественности и 15 мес — с 4-й. В настоящий момент разрабатывается множество подходов к терапии глиом с целью улучшить выживаемость пациента и уменьшить силу побочных эффектов. Одним из таких способов являются онколитические вирусы (ОВ), которые обладают широким спектром механизмов действия, и наиболее востребованным из которых является система тимидинкиназы вируса *H. Simplex* и ганцикловира (ТК-ГЦВ). Система ТК-ГЦВ основана на возможности индукции апоптоза за счет фосфорилирования ГЦВ и конкурентного замещения им дГТФ при репликации, что приводит к множественным ошибкам в геноме и апоптозу клеток.

В данном исследовании нами созданы онколитические вирусы (лентивирусы), содержащие ген *TK*, и оценена эффективность системы *TK*-ГЦВ в отношении клеток глиом человека (линейные глиомы U87 и U251, а также первичные культуры глиом, полученные из операционного материала). Эффективность трансдукции клеток глиом составила более 80%. Использование онколитических вирусов на линейных и первичных клетках глиом, полученных от пациентов, в сочетании с ГЦВ значительно (на 40%) снижает пролиферацию клеток (экспрессию ядерного маркера пролиферации Ki-67), а также индуцирует в опухолевых клетках апоптоз (увеличивает экспрессию BAX на 25%). Анализ цитотоксичности ГЦВ (МТТ-тест) также показал достоверное увеличение гибели клеток опухоли через 5 сут после введения максимально допустимой концентрации ГЦВ 2 мкМ. Кроме того, использование ГЦВ существенно снизило миграторный потенциал клеток глиом, экспрессирующих *TK*, по сравнению с контрольными клетками (клеток линии U87 на 20%, а U251 на 100%). Полученные результаты показали эффективность онколитической терапии на клеточных моделях *in vitro* и заложили основу дальнейшей трансляции результатов на мышинные модели *in vivo*.

Романова О.А.¹, Кляйн О.И.^{1,2}, Сытина Е.В.¹✉, Тенчурин Т.Х.¹, Пацаев Т.Д.¹, Чвалун С.Н.¹, Пантелеев А.А.^{1,3}

Потенциал нетканых матриц в биоинженерии трахеального эпителия

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт биохимии им. А.Н. Баха, Москва, Россия

³ ФГБУ «НМИЦ хирургии им. А.В. Вишневского», Москва, Россия

✉ esytina@mail.ru

Аннотация. Было показано, что эффективность использования биоразлагаемых нетканых матриц для создания аналога эпителия трахеи зависит как от состава материала, так и от наличия фибробластов, которые, в свою очередь, необходимы для сборки базальной мембраны и закрепления эпителия на матрице.

Ключевые слова: эквивалент трахеального эпителия; нетканые материалы; дифференцировка клеток; электроспиннинг; базальная мембрана; 3D-культура клеток; тканевая инженерия.

Romanova O.A.¹, Klein O.I.^{1,2}, Sytina E.V.¹, Tenchurin T.H.¹, Patsaev T.D.¹, Chvalun S.N.¹, Panteleyev A.A.^{1,3}

Nonwovens potential in tracheal epithelium bioengineering

¹ NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² FRC “Fundamentals of Biotechnology” of the Russian Academy of Sciences, Bach Institute of Biochemistry, Moscow, Russia

³ A.V. Vishnevsky Institute of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. The study has shown that the efficacy of biodegradable nonwoven matrices use for generation of tracheal epithelium analogue depends on both, the material composition and the presence of fibroblasts which appear to be essential for basal membrane assembly and epithelium anchoring on the matrix.

Keywords: tracheal epithelial equivalent; nonwovens; cell differentiation; electrospinning; basement membrane; 3D cell culture; tissue engineering.

Создание тканеинженерного трахеального эпителия для применения в фармакологии, токсикологии и клинической практике является важной биотехнологической задачей. Ключевым элементом этого процесса является выбор матрикса, который должен поддерживать формирование эпителиального пласта. Такой матрикс должен обладать физико-химическими свойствами, обеспечивающими высокую проницаемость, а также нести молекулярные детерминанты для специфической клеточной адгезии. Традиционно для создания подобных матриц используются фибриновые и коллагеновые гидрогели, которые недостаточно прочны и имеют ограниченную проницаемость. Децеллюляризованные ткани сохраняют природную 3D-структуру, однако их ограниченная проницаемость, сложность производства и значительные различия в зависимости от донора затрудняют стандартизацию и снижают воспроизводимость результатов. Губчатые материалы также ограничены в применении, поскольку плохо воспроизводят архитектуру внеклеточного матрикса, а их структурные характеристики сложно контролировать в процессе производства.

Перспективной альтернативой являются нетканые материалы, волокнистая структура которых напоминает естественный внеклеточный матрикс. Метод электроспиннинга, применяемый для их получения, позволяет точно регулировать диаметр и ориентацию волокон, что позволяет контролировать поведение клеток в процессе формирования тканевого эквивалента. Однако на сегодняшний день сведения о применении нетканых матриц для создания бронхо-трахеального эпителия практически отсутствуют. В исследовании использовались биоразлагаемые нетканые матрицы, которые обладают существенными преимуществами. Они не только позволяют исследовать процесс формирования эпителия и базальной мембраны в ходе

замещения матрикса новой тканью, но и служат эффективным инструментом изучения взаимодействий тканевых эквивалентов с организмом *in vivo*.

В рамках данного исследования была проведена оценка способности нетканых материалов поддерживать формирование жизнеспособного трахеального эпителия и базальной мембраны. Также исследовалась роль фибробластов в этих процессах. Рассматривались два типа матриксов: натуральный, состоящий из коллагена I типа, сшитого генипином, и преимущественно синтетический матрикс (хитозан и полилактид с добавлением 7% желатина). На этих матриксах были созданы комплексные (эпителий/фибробласты) и чисто эпителиальные эквиваленты на основе первичных культур эпителиоцитов и фибробластов трахеи человека. В полученных конструктах оценивались морфология эпителия, экспрессия специфических маркеров реснитчатых и бокаловидных клеток (Tub4 и Muc 5AC), а также структура и экспрессия белковых компонентов базальной мембраны, включая коллаген IV и ламинин 5. Для анализа были использованы методы световой, иммуно-флуоресцентной и электронной микроскопии.

Полученные результаты показали, что как синтетические, так и натуральные нетканые материалы обладают достаточной биосовместимостью и подходят для получения трахеального эпителия. Тем не менее качество (морфология и стабильность) образующегося эпителия зависит от состава используемого материала и наличия фибробластов. Без фибробластов на натуральном матриксе эпителий местами отслаивался, а на синтетическом — не формировался вовсе. Даже при совместном культивировании с фибробластами синтетические матриксы поддерживают формирование эпителия и базальной мембраны (basal lamina) менее эффективно, чем натуральные. Таким образом, фибробласты оказались необходимыми для сборки структур базальной мембраны и, соответственно, для эффективного закрепления биоинженерного эпителия на матриксе, независимо от типа используемого материала. Формирование базальной мембраны критично для успешной биоинженерии бронхо-трахеального эпителия.

Предлагаемый алгоритм создания эквивалента трахеального эпителия может быть эффективным инструментом изучения механизмов формирования эпителия и базальной мембраны *de novo* в искусственных условиях.

Рубина К.А. ✉, Сысоева В.Ю., Арбатский М.С., Ткачук В.А.

Участие T-кадгерина в регуляции обновления и дифференцировки МСК жировой ткани

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ rkseniya@mail.ru

Аннотация. Экспрессия T-кадгерина в клетках МСК определяет dormant субпопуляцию стволовых/прогениторных клеток, не склонных к адипогенной дифференцировке и пролиферации и оказывающих регуляторное действие на всю популяцию в целом. Нокаут T-кадгерина приводит к коммитированию МСК в адипогенном направлении.

Ключевые слова: T-кадгерин; адипонектин; стволовые/прогениторные клетки; регуляция адипогенной дифференцировки.

Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., Arbatsky M.S., Tkachuk V.A.

Participation of T-cadherin in the regulation of renewal and differentiation of adipose tissue MSCs

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. T-cadherin expression in MSCs defines a dormant subpopulation of stem/progenitor cells that are prone to adipogenic differentiation and proliferation and have a regulatory effect on the entire population. T-cadherin knockout leads to MSC commitment in the adipogenic direction.

Keywords: T-cadherin; adiponectin; stem/progenitor cells; regulation of adipogenic differentiation.

Направленный рост нервов и сосудов регулируется навигационными рецепторами, к числу которых относится T-кадгерин. Помимо ранее обнаруженных свойств T-кадгерина негативно регулировать рост сосудов и нервов, T-кадгерин является рецептором двух лигандов, высокомолекулярного адипонектина (HMW адипонектин) и липопротеидов низкой плотности (ЛНП), оказывающих противоположные физиологические эффекты. Адипонектин является уникальным цитокином, который продуцируют адипоциты жировой ткани. Адипонектин оказывает стимулирующее действие на метаболизм липидов и глюкозы и имеет инсулин-сенситизирующие и противовоспалительные эффекты. Уровень адипонектина снижен в плазме крови пациентов с метаболическим синдромом (ожирением, диабетом II и атеросклерозом, ишемической болезнью сердца, гипертензией, инфарктом миокарда). Протективные эффекты адипонектина в сердечно-сосудистой системе опосредуются его взаимодействием с T-кадгерин. T-кадгерин экспрессируется в жировой ткани, однако до сих пор неизвестно, в каких клетках и какую функцию он выполняет. Мы предположили, что T-кадгерин участвует в процессах обновления и дифференцировки клеток жировой ткани, тем самым влияя на формирование разных типов адипоцитов и продукцию адипонектина.

Подкожная жировая ткань включает различные типы клеток, такие как зрелые адипоциты, стволовые/прогениторные клетки, сосудистые и иммунные клетки. Известно несколько типов функционально различающихся адипоцитов, которые секретируют разный спектр гормонов. Популяция мезенхимных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани гетерогенна и представляет собой клетки с различным дифференцировочным потенциалом. Стволовые/прогениторные клетки, способные к активной пролиферации и дифференцировке в адипоциты, экспрессируют маркер DPP4 (Dipeptidyl peptidase-4). Мы обнаружили и охарактеризовали новую популяцию в составе МСК жировой ткани, клетки которой экспрессируют DPP4 и T-кадгерин. Эта

субпопуляция обладает сниженным пролиферативным потенциалом и не дифференцируется в адипогенном направлении при добавлении дифференцировочного коктейля факторов. Для Т-кадгерин-экспрессирующих клеток характерна экспрессия генов стволовости и маркеров экзосом. Присутствие даже небольшого количества Т-кадгерин-гиперэкспрессирующих клеток в культуре МСК снижает их способность к адипогенной дифференцировке в целом.

Нокаут Т-кадгерина приводит к спонтанной дифференцировке МСК в адипоциты, а при индукции дифференцировки такие клетки имеют повышенный адипогенный потенциал. Экспрессия Т-кадгерина также определяет влияние ЛНП и HMW адипонектина на процессы адипогенеза. ЛНП стимулируют адипогенную дифференцировку в нокаутных по Т-кадгерину МСК значительно сильнее, чем в контрольных. Добавление HMW адипонектина в среду культивирования подавляет адипогенную дифференцировку МСК, в то время как нокаут Т-кадгерина повышает чувствительность к подавляющему воздействию HMW адипонектина. Эти данные позволяют сделать предположение о существовании петли обратной связи с участием Т-кадгерина, регулирующей процессы адипогенной дифференцировки и метаболизма.

Таким образом, экспрессия Т-кадгерина в клетках МСК определяет дормантную субпопуляцию стволовых/прогениторных клеток, не склонных к адипогенной дифференцировке и пролиферации и оказывающих регуляторное действие на всю популяцию в целом. Нокаут Т-кадгерина приводит к коммитированию МСК в адипогенном направлении.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, гранты № 19-75-30007 и 23-11-00205.

Русинова Т.В. ✉, Асякина А.С., Солоп Е.А.

Морфологическая оценка эффективности регенерации нерва после имплантации биосинтетического кондуита

Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

✉ rusinova.tv@mail.ru

Аннотация. В исследовании был проведен сравнительный анализ эффективности регенерации нерва после имплантации аутографта и разработанного кондуита нерва на основе электропроводящей мембраны с гидрогелевым наполнителем. Регенерация оценивалась с помощью гистологического и иммуногистохимического анализа образцов.

Ключевые слова: периферический нерв; гидрогель; конduit нерва; аксон; регенерация; электропроводящая мембрана.

Rusinova T.V., Asyakina A.S., Solop E.A.

Morphological assessment of the effectiveness of nerve regeneration after implantation of a biosynthetic conduit

Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

Abstract. In the study we compared the effective of nerve regeneration after implantation of an autograft and a nerve conduit based on electrically conductive membrane with a hydrogel. We assessed regeneration using histological and immunohistochemical analysis of the samples.

Keywords: peripheral nerve; hydrogel; nerve conduit; axon; regeneration; electrically conductive membrane.

Поиск и разработка материалов для микрохирургического лечения периферических нервов остается актуальной проблемой. Необходимо создать конструкцию (нервный конduit), которая будет не только соединять проксимальный и дистальный концы нерва, но и стимулировать направленный рост аксонов. При этом наличие электрохимической проводимости может способствовать стимуляции направленного роста нервов, сокращая время и улучшая результаты регенерации поврежденного участка [1].

Цель данного исследования — создание кондуита нерва на основе электропроводящей мембраны и оценка его эффективности при регенерации периферического нерва.

Для создания биосинтетического кондуита нерва был разработан наполнитель, в роли которого выступал гидрогель на основе гидролизованного коллагена, полученный с помощью щелочного гидролиза 5% раствором гидроксида натрия дермы свиньи. Каркас кондуита нерва создавался на базе ФГБОУ ВО КубГУ из комплекса электропроводящей мембраны «Nafion» и полилактида. Исследование проводилось на самцах крыс линии Wistar, весом 180 ± 10 г. Животным моделировали дефект седалищного нерва (11 ± 2 мм), с дальнейшей имплантацией: группа 1 — аутографт ($n = 5$), группа 2 — биосинтетический конduit нерва с электропроводящей мембраной «Nafion» с интраоперационным введением 200 мкл гидрогеля на основе гидролизованного коллагена ($n = 5$), группа 3 — полый конduit нерва из электропроводящей мембраны «Nafion» ($n = 5$). На 90-е сутки эксплантировали образцы с дальнейшим гистологическим и иммуногистохимическим анализом биоптатов. При гистологическом исследовании образцы окрашивали гематоксилином и эозином, при иммуногистохимическом анализе оценивали экспрессию основного миелинового белка (МБП), холинацетилтрансферазы (ChAT), легких цепей нейрофиламентов (NEFL). Микроскопическое исследование проводилось на микроскопе Olympus CX41 (Olympus, Япония). При сравнении значений между группами

использовали критерий Манна–Уитни, внутри групп — критерий Вилкоксона. Нулевую гипотезу отвергали при уровне значимости $p < 0,05$. Все хирургические вмешательства осуществлялись с применением газового наркоза «Изофлуран» (индукция 2–5%, поток 0,25–4%) в стерильных условиях.

При эксплантации образцов их делили на три фрагмента: проксимальный (до имплантации нерва), медиальный (имплант нерва), дистальный (после имплантации нерва). В ходе гистологического анализа было выявлено, что в проксимальном фрагменте во всех группах морфологическая картина была сопоставима, было выявлено значительное количество аксонов и отсутствие дегенерации ткани. Медиальные фрагменты образцов из группы 1 характеризовались незначительным глиозом и слабо выраженной дегенерацией аксонов, воспалительная реакция отсутствовала. Гистологическая картина медиальных фрагментов в группе 2 выявила значительное количество аксонов без дегенеративных и воспалительных изменений, в образцах наблюдались мелкие очаги волокнистой соединительной ткани. В группе 3 гистологический анализ медиального фрагмента характеризовался скоплением крупных нервных волокон и фрагментами имплантированного материала. При гистологическом исследовании дистального фрагмента в группах 1 и 2 результаты были сопоставимы и характеризовались значительным количеством аксонов и слабо выраженным глиозом. В группе 3 при анализе дистального фрагмента были отмечены пучки нервных волокон, вокруг которых образовалась соединительная ткань.

При иммуногистохимическом анализе в группах 1 и 2 была выявлена высокая экспрессия исследуемых маркеров на протяжении всего регенерирующего нерва. Однако было замечено незначительное снижение содержания MBP, ChAT, NEFL по направлению от проксимального фрагмента к дистальному. Так, в проксимальном фрагменте занимаемые площади MBP, ChAT, NEFL от площади среза в группе 1 составили 83,2 [79,4; 88,3]%, 16,5 [14,1; 19,4]%, 23,7 [18,1; 25,5]%, в группе 2: 79,8 [76,5; 83,2]%, 15,7 [13,2; 18,1]%, 19,6 [16,4; 22,3]%, в группе 3: 77,1 [74,6; 81,7]%, 14,4 [11,7; 16,3]%, 15,2 [13,5; 17,1]%, соответственно, ($p > 0,05$). В дистальной части занимаемые площади MBP, ChAT, NEFL составили в группе 1: 58,9 [54,3; 61,5]%, 11,6 [9,4; 13,7]%, 19,2 [17,1; 23,4]%, в группе 2: 75,3 [71,7; 78,3]%, 11,4 [10,1; 12,4]%, 16,5 [14,8; 18,7]%, в группе 3: 69,1 [67,3; 73,6]%, 9,4 [7,6; 11,4]%, 12,6 [10,4; 15,5]%, соответственно, ($p > 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что биосинтетический конduit нерва способствует росту аксонов за счет находящейся в его составе электропроводящей мембраны и гидрогеля на основе коллагена, который, вероятно, создает благоприятное адгезионное микроокружение. Результаты позволяют предположить, что разработанный биосинтетический конduit нерва может быть аналогом аутографта при микрохирургическом лечении периферического нерва.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00540.

Список литературы

1. Stocco E., Barbon S., Emmi A., et al. Bridging gaps in peripheral nerves: from current strategies to future perspectives in conduit design // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 11. P. 9170. doi: 10.3390/ijms24119170

Ручко Е.С. ✉, Голубинская П.А., Пикина А.С., Смирнов И.П., Гордеева В.Д., Арапиди Г.П., Еремеев А.В.

Пролиферативная активность и профили экспрессии генов 2D- и 3D-культур хондроцитов различного генеза

ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Москва, Россия

✉ ruchkoevgeny@yandex.ru

Аннотация. В данной работе представлен анализ протеомных и транскриптомных профилей хондроцитов, полученных от здоровых доноров, доноров, страдающих артрозами, а также хондроцитоподобных производных ИПСК. Полученный массив данных позволяет выявить пути к модификации протоколов дифференцировки ИПСК.

Ключевые слова: хондроциты; ИПСК; внеклеточный матрикс; гликозаминогликаны; сфероиды; артрит.

Ruchko E.S., Golubinskaya P.A., Pikina A.S., Smirnov I.P., Gordeeva V.D., Arapidi G.P., Ereemeev A.V.

Proliferative activity and gene expression profiles of 2D- and 3D-cultures of different genesis chondrocytes

Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. This work presents an analysis of the proteomic and transcriptomic profiles of chondrocytes derived from healthy donors, arthritic donors and chondrocyte-like derivatives of iPSCs. The obtained data set provides an opportunity to identify ways to modify hPSCs differentiation protocols.

Keywords: chondrocytes; iPSCs; extracellular matrix; glycosaminoglycans; spheroids; arthritis.

В настоящее время на биотехнологическом рынке представлены клеточные продукты на основе аутологичных хондроцитов для восстановления хрящевой ткани. Однако подобные продукты в основном используются для коррекции незначительных повреждений суставных хрящей. При наличии объёмных повреждений хрящевой ткани и длительном воспалении получение клеточного материала в количестве, достаточном для создания полноценного импланта, становится невозможным, а при наследственных патологиях вовсе нереально получить функциональный клеточный материал. Развитие технологий с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открывает перед исследователями новые возможности в области создания тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины [1]. Для хондроцитов, дифференцированных из ИПСК, характерен ювенильный фенотип, высокая скорость пролиферации и высокое содержание внеклеточного матрикса, что может способствовать более эффективному заживлению суставных дефектов [2]. Несмотря на множество преимуществ, клеточные технологии, основанные на применении ИПСК, имеют ряд нерешённых проблем, среди которых стандартизация протоколов получения и дифференцировки [3].

В данной работе были получены и проанализированы транскриптомные (RNA-seq) и протеомные (LC-MS) профили 2D-клеточных культур хондроцитов, выделенных из биоптатов как здоровых доноров, так и пациентов с различными вариантами патологий, а также полученных на их основе 3D-клеточных культур — сфероидов. Аналогичные профили были получены для 2D- и 3D-культур ИПСК и дифференцированных из ИПСК хондроцитоподобных производных.

Анализ протеомных профилей показал, что для нативных хондроцитов, по сравнению с хондроцитоподобными производными ИПСК, характерны повышенные уровни экспрессии генов, участвующих в процессах клеточной адгезии, миграции и организации внеклеточных структур. Среди генов с пониженной

экспрессией выявлены гены, вовлеченные в регуляцию пролиферации клеток и процессинг некодирующих РНК. При сравнении ИПСК и хондроцитоподобных дифференцированных производных было выявлено обогащение Wnt и MAPK сигнальных путей, а при сравнении 2D- и 3D-культур нативных хондроцитов было выявлено обогащение Rap1 сигнального пути, участвующего в таких клеточных процессах, как адгезия, полярность и образование межклеточных взаимодействий. При сравнении хондроцитов, полученных от больных и здоровых пациентов, была выявлена дифференциальная экспрессия генов, ассоциированных с клеточным делением. Например, в топ 20 статистически значимо up-регулируемых генов в хондроцитах от больных доноров входили CENPF, CDCA8, PRC1, BUB1B, KIF4A. По протеомным данным дифференциально экспрессируемые белки выявлены не были. При сравнении транскриптомных профилей хондросфер, полученных из биоптатов пациентов с гонартрозом, с хондросферами от здоровых доноров; 2D- и 3D-культур из ИПСК-производных с 2D- и 3D-культурами, выделенными из биоптатов пациентов, была обнаружена up-регуляция генов, связанных с PCNA и участвующих в делении клеток. Аналогичные паттерны наблюдали по результатам анализа протеомных данных.

Оценка уровня пролиферации с помощью имиджинговой системы JuLI Stage показала, что наименьшая скорость роста наблюдалась в культурах хондроцитов, полученных от больных пациентов. Для дифференцированных в хондроцитарном направлении ИПСК-производных характерна сниженная пролиферативная активность по сравнению с нативными ИПСК и повышенная по сравнению с хондроцитами от пациентов с патологиями суставного хряща.

Комплексный анализ профилей экспрессии генов нативных хондроцитов и хондроцитоподобных производных ИПСК позволил как получить информацию об активных сигнальных путях, участвующих в хондрогенезе при дифференцировке ИПСК, так и модифицировать данные протоколы дифференцировки, в целях получения образцов клеточных продуктов, максимально близких по своим свойствам к нативной хрящевой ткани. Во многом этого можно достичь с помощью более длительного культивирования хондроцитоподобных производных в виде 3D-культур клеток, благодаря поддержанию различных физических, химических и биологических условий среды в значениях более близких к естественным.

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-15-00250).

Список литературы

1. Cerneckis J., Cai H., Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications // *Sig Transduct Target Ther.* 2024. Vol. 9, N 1. P. 112. doi: 10.1038/s41392-024-01809-0
2. Wu C., Dicks A., Steward N., et al. Single cell transcriptomic analysis of human pluripotent stem cell chondrogenesis // *Nat Commun.* 2021. Vol. 12, N 1. P. 362. doi: 10.1038/s41467-020-20598-y
3. Madrid M., Lakshmi U., Zhang X., et al. Considerations for the development of iPSC-derived cell therapies: a review of key challenges by the JSRM-ISCT iPSC Committee // *Cytotherapy.* 2024. Vol. 26, N 11. P. 1382–1399. doi: 10.1016/j.jcyt.2024.05.022

Рябинин А.А. ✉, Панкратова М.Д., Калабушева Е.П., Старинов З.Р., Сабиров М.С.,
Чикина Е.А., Воротеляк Е.А., Васильев А.В.

YAP/TAZ сигналинг в развитии кожи человека на модели дифференцировки эмбрионидных телец из ЧИПСК в кожные органоиды

ИБР РАН им. Н.К. Кольцова, Москва, Россия

✉ andrey951233@mail.ru

Аннотация. Роль сигнального пути YAP/TAZ в развитии кожи до конца не изучена. В данной работе с помощью методов пространственной транскриптомики, РНК-секвенирования и IGH мы изучили динамику экспрессии и активности всех основных компонентов сигнального пути YAP/TAZ в различных субпопуляциях во время развития органоидов кожи, полученных в ходе дифференцировки ЧИПСК.

Ключевые слова: ЧИПСК; дифференцировка; кожные органоиды; волосяной фолликул; YAP/TAZ сигналинг; Hippo сигналинг.

Riabinin A.A., Pankratova M.D., Kalabusheva E.P., Starinov Z.R., Sabirov M.S., Chikina E.A.,
Vorotelyak E., Vasiliev A.V.

YAP/TAZ signalling in human skin development on a model of embrioid bodies from hiPSCs into skin organoids differentiation

Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Science, Moscow, Russia

Abstract. The role of YAP/TAZ signalling in skin development is not fully understood. In this work using spatial transcriptomics, single cell RNA-seq and IGH methods, we studied the dynamic of expression and activity of all main components of YAP/TAZ signalling pathways in different subpopulation during hiPSCs-derived skin organoids development.

Keywords: hiPSCs; differentiation; dermal organoids; hair follicle; YAP/TAZ signalling; Hippo signalling.

Дифференцировка эмбрионидных телец из индуцированных плюрипотентных клеток человека (ЧИПСК) в кожные органоиды является идеальной моделью для изучения сигнальных путей, участвующих в эмбриогенезе кожи [Lee et al., 2021]. В частности, роль сигнального пути YAP/TAZ (часть сигнального пути Hippo) в этом процессе до сих пор остается не до конца понятной. В данной работе с помощью методов пространственной транскриптомики, РНК-секвенирования на уровне одиночных клеток и иммуногистохимических методов мы изучили динамику экспрессии и активности всех основных компонентов сигнального пути YAP/TAZ (YAP1, WWTR1 (TAZ), TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4, CCN1, CCN2) в эпителиальной, мезенхимной и нейральной субпопуляциях в процессе развития органоидов кожи. В результате были выявлены закономерности активации и экспрессии YAP и TAZ в различных субпопуляциях, их коэкспрессия с TEAD 1–4, а также закономерности экспрессии мишеней YAP/TAZ, что до этого не было показано ни на одной из ранее протестированных аналогичных моделей. Помимо этого, на основе полученных данных были выдвинуты гипотезы о связи YAP1 с развитием нейральных производных нервного гребня, а также волосяного фолликула и WWTR1 (TAZ) с развитием мезенхимы и ее производных в составе кожи лицевой части черепа человека. Также в ходе изучения YAP/TAZ сигнального пути ни в одной из проанализированных субпопуляций не была выявлена экспрессия TEAD4. Данный факт позволяет утверждать, что этот компонент YAP/TAZ сигнальной

системы не участвует в эмбриогенезе кожи. Данные, полученные в процессе исследования, в дальнейшем могут быть использованы для изучения других сигнальных путей в эмбриогенезе кожи, а также траекторий и механизмов дифференцировки нервного гребня.

Работа была поддержана грантом РФФ № 21-74-30015.

Список литературы

1. Lee J., Koehler K.R. Skin organoids: a new human model for developmental and translational research // *Exp Dermatol.* 2021. Vol. 30, N 4. P. 613–620. doi: 10.1111/exd.14292

Рябов В.М.¹ ✉, Тяпкин Н.И.², Гужова И.В.¹

Органоиды из опухолевой и нормальной тканей простаты как модель для тестирования противораковых препаратов энзалутамид и абиратерон

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Ленинградский региональный клинический онкологический диспансер имени Л.Д. Романа, МЗ РФ, Кузьмолово, Россия

✉ voldemryabov@yandex.ru

Аннотация. В нашем исследовании мы использовали органоидные культуры для изучения опухолевой и нормальной тканей простаты для тестирования противоопухолевых антиандрогенных препаратов абиратерона и энзалутамида, которое показало, что энзалутамид оказывал более сильное ингибирующее действие на рост клеток.

Ключевые слова: рак предстательной железы; клеточные культуры простаты; органоидные культуры; противораковая терапия; антиандрогенные препараты; персонифицированная терапия.

Ryabov V.M.¹, Tyapkin N.I.², Guzhova I.V.¹

Organoids from tumor and normal prostate tissues as a model for testing the anticancer drugs enzalutamide and abiraterone

¹ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Roman Leningrad Regional Clinical Oncology Dispensary, Ministry of Health of the Russian Federation, Kuzmolovo, Russia

Abstract. In our study, we used organoid cultures of tumor and normal prostate tissues to test the antitumor antiandrogenic drugs abiraterone and enzalutamide, which showed that enzalutamide had a stronger inhibitory effect on cell growth.

Keywords: localized prostate cancer; prostate cell cultures; patient derived organoids (PDOs); anti-cancer therapy; antiandrogenic drugs; personalized therapy.

Рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется в течение жизни у 27% взрослых мужчин, а смертность от РПЖ в США достигла в 2022 г. 11% от всех онкологических заболеваний. В России это 15% и 6% соответственно. 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. Для преодоления такой устойчивости необходимо заранее понимать влияние лекарственного средства на конкретного пациента, что требует развития такого направления, как персонифицированная терапия.

В настоящее время в области изучения рака предстательной железы активно развивается направление органоидных культур (ОК), заключающееся в 3D-культивировании клеток, полученных из опухолевой и нормальной тканей ПЖ пациентов, оперированных по поводу РПЖ. Такие культуры в специальной среде и 3D-подложке из Матригеля сохраняют свойства исходной опухоли в течение продолжительного времени [1]. Важно, что органоиды простаты могут быть созданы из доброкачественных и раковых тканей мышиноного или человеческого происхождения, и они сохраняют фенотипические и генотипические особенности, обнаруженные *in vivo*. Кроме того, органоиды простаты легко поддаются генетическим манипуляциям с помощью CRISPR/Cas9. Таким образом, органоидные культуры из ткани простаты являются подходящей

модельной системой для тестирования лекарственных средств и выяснения механизмов резистентности к ним [2].

В исследовании были использованы лекарственные препараты, показанные при лечении РПЖ, абиратерон и энзалутамид, оба относятся к группе антиандрогенных препаратов с противоопухолевой активностью. В 24-луночный планшет к 2D-культуре опухолевых и нормальных клеток, полученных от пациентов, добавляли растворенные препараты в концентрации 10 μM на 500 мкл среды DMEM. В такой же концентрации в 24-луночный планшет добавляли препараты в среду к органоидным культурам. Для контроля использовали опухолевые и нормальные 2D- и органоидные культуры, к которым добавлялся только растворитель лекарственных средств. Клетки культивировали в течение 10 суток. Были использованы образцы от 9 пациентов. Подсчет клеток для 2D-культур осуществлялся в камере Горяева, а подсчет органоидных культур производился под проходящим светом на микроскопе Axiovert 200M (Германия). При измерении ОК распределялись на 3 группы: 1-я — ОК небольшого размера (10–25 мкм), 2-я — ОК среднего размера (26–50 мкм), 3-я — ОК большого размера (51–100 мкм).

Результаты показали, что энзалутамид вызывал большее ингибирование роста как опухолевых, так и нормальных клеток по сравнению с абиратероном как в 2D-культурах, так и в органоидных культурах. Ни в одном из образцов не наблюдалось резистентности к лекарственным средствам. Также ни один из пациентов не обращался после радикальной простатэктомии к лечащему врачу, что косвенно может подтверждать отсутствие резистентности к лекарственным препаратам. При этом в ОК из опухолевой ткани при добавлении абиратерона наблюдалось увеличение количества органоидов среднего размера по сравнению с небольшим и большим размерами. Наши данные показывают, что ОК, полученные от опухолевой и нормальной ткани, можно использовать в качестве модели для тестирования лекарственных средств при персонализированной терапии.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00162.

Список литературы

1. Ryabov V.M., Baryshev M.M., Voskresenskiy M.A., et al. Early cell cultures from prostate cancer tissue express tissue specific epithelial and cancer markers // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 3. P. 2830. doi: 10.3390/ijms24032830
2. Pappas K.J., Choi D., Sawyers C.L., et al. Prostate organoid cultures as tools to translate genotypes and mutational profiles to pharmacological responses // *J Vis Exp*. 2019. N 152. doi: 10.3791/60346

Сабилова С.В. ✉, Сыромятникова В.Ю., Ханнанов А.А., Гомзикова М.О.

Сравнительный анализ выхода внеклеточных и индуцированных микровезикул методом NTA

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ kurbangaleeva_s@mail.ru

Аннотация. Микровезикулы, получаемые из мезенхимных стволовых клеток, обладают высоким терапевтическим потенциалом. В данной работе мы провели сравнительный анализ выхода внеклеточных и индуцированных цитохалазином В микровезикул с использованием анализа траекторий наночастиц (NTA).

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; микровезикулы; мезенхимные стволовые клетки; цитохалазин В; анализ траекторий наночастиц.

Sabirova S.V., Syromyatnikova V.Y., Khannanov A.A., Gomzikova M.O.

Comparative analysis of the yield of extracellular and induced microvesicles by the NTA method

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells have high therapeutic potential. In this study, we comparatively analysed the yield of extracellular and cytochalasin B-induced microvesicles using nanoparticle tracking analysis (NTA).

Keywords: extracellular vesicles; microvesicles; mesenchymal stem cells; cytochalasin B; nanoparticle tracking analysis (NTA).

Терапия с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК) сопряжена с определенными рисками, однако внеклеточные везикулы (ВВ), выделяемые МСК, сохраняют терапевтический потенциал без риска онкотрансформации, что делает их более безопасным инструментом. Тем не менее ограниченный выход ВВ остается препятствием для их клинического применения. Метод, предложенный Pick и его соавторами, позволяет получать индуцированные микровезикулы с помощью цитохалазина В (МВ-ЦВ) в значительных количествах путем ингибирования полимеризации актиновых филаментов цитоскелета [1]. Хотя ранее было показано, что индуцированные микровезикулы имеют сходный с родительскими клетками состав и иммунофенотип, а также ангиогенную активность, прямое сравнение выхода ВВ и МВ-ЦВ не проводилось. В данной работе мы провели сравнительный анализ выхода внеклеточных и индуцированных цитохалазином В микровезикул с использованием анализа траекторий наночастиц (NTA), который позволяет точно измерять концентрацию и размер везикул в растворе, обеспечивая детальное представление об их распределении.

МСК были получены из жировой ткани мыши с использованием коллагеназы II. Выделенные клетки использовали для получения МВ-ЦВ, кондиционированную среду (КС) использовали для сбора ВВ. Фетальную бычью сыворотку, используемую для приготовления среды для культивирования МСК и сбора ВВ, очищали предварительно от присутствующих в ней ВВ путем ультрацентрифугирования в течение 18 ч при 4 °С. В данной работе были проанализированы осадки, полученные после центрифугирования КС при 2300×g, 10 000×g и 100 000×g. Для получения МВ-ЦВ клетки обрабатывали 10 мкг/мл цитохалазина В в течение 30 мин (37°С, 5% CO₂). Затем суспензию клеток активно перемешивали в течение 30 сек и подвергали последовательному центрифугированию при 300×g — 5 мин, 300×g — 10 мин, 2300×g — 25 мин, 10 000×g — 45 мин при 4°С и 100 000×g — 90 мин при 4°С. Анализ NTA проводили на приборе NanoSight LM-10 (Malvern Instruments, Великобритания).

На первом этапе было оценено количество подобных внеклеточным везикулам частиц в среде, очищенной от ВВ, и в КС от МСК. Анализ методом NTA показал, что среда, очищенная от ВВ, содержала значительное количество частиц, похожих на ВВ, что могло внести ошибки в результаты анализа. При $2300\times g$ количество выделенных из КС ВВ составило $4.7\pm 1.4\times 10^9$ частиц/мл, тогда как частиц, похожих на ВВ, в осадке было 9.5×10^9 частиц/мл. При скорости центрифугирования $10\ 000\times g$ было обнаружено $1,5\times 10^{10}$ частиц/мл подобных везикулам частиц и только $5,1\pm 0,3\times 10^9$ частиц/мл ВВ были осаждены из КС. Количество ВВ, выделенных из КС, превышало количество подобных везикулам частиц только при центрифугировании $100\ 000\times g$ — $8,1\pm 5\times 10^{10}$ частиц/мл и $5,1\times 10^9$ частиц/мл соответственно. Использование среды без сыворотки для культивирования МСК позволило устранить эту проблему, и было показано, что количество МВ-ЦВ значительно превышает количество ВВ на всех этапах центрифугирования, особенно при скорости центрифугирования $100,000\times g$, где разница составила $5\pm 3.9\times 10^{10}$ частиц/мл против 2×10^9 частиц/мл соответственно.

Наши данные показали, что количество МВ-ЦВ МСК значительно превышало количество ВВ после каждого этапа центрифугирования ($2300\times g$, $10\ 000\times g$ и $100\ 000\times g$) в 5, 9 и 20 раз соответственно. Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Список литературы

1. Pick H., Schmid E.L., Tairi A.P., et al. Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles // *J Am Chem Soc.* 2005. Vol. 127, N 9. P. 2908–2912. doi: 10.1021/ja044605x

Сабиров Д.Х. ✉, Давлетшин Э.Ф., Тимофеева А.В., Агеева Т.В., Мухамедшина Я.О.

Влияние двигательной реабилитации на структурные и молекулярные изменения в спинном мозге при травме спинного мозга крысы

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ davraniwe@gmail.com

Аннотация. Травма спинного мозга вызывает гибель нейронов и повреждение гемато-спинномозгового барьера. Исследование направлено на оценку влияния двигательной реабилитации на сохранность и молекулярные изменения травмированного спинного мозга крысы с акцентом на каудальные сегменты.

Ключевые слова: травма спинного мозга; двигательная реабилитация; гемато-спинномозговой барьер; нейропластичность.

Sabirov D.K., Davletshin E.F., Timofeeva A.V., Povysheva T.V., Mukhamedshina Ya.O.

The impact of motor rehabilitation on structural and molecular changes in the spinal cord following spinal cord injury in rats

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Spinal cord injury leads to neuronal death and disruption of the blood-spinal cord barrier. This study aims to assess the impact of motor rehabilitation on the preservation and molecular changes in the injured rat spinal cord, with a focus on caudal segments.

Keywords: spinal cord injury; motor rehabilitation; blood-spinal cord barrier; neuroplasticity.

Травма спинного мозга (ТСМ) вызывает серьезные нарушения двигательных и чувствительных функций, что связано с гибелью нейронов и глии, а также повреждением аксонов и гемато-спинномозгового барьера (ГСМБ). Двигательная реабилитация представляет собой перспективный подход к восстановлению, однако её влияние на сохранение миелиновых волокон и целостность ГСМБ, особенно в сегментах, удалённых от эпицентра травмы, остаётся недостаточно изученным. Цель данного исследования заключалась в оценке структурных изменений, включая целостность ГСМБ, в сегментах, отдалённых от области повреждения спинного мозга, на фоне проведения реабилитационной двигательной нагрузки.

Исследование проводилось на модели ТСМ крысы на уровне Th8 с анализом грудного (T9) и поясничного (L2) сегментов. В поясничном сегменте в группе с ТСМ и двигательной реабилитацией (ТСМ + ДРеаб) наблюдалось значительное увеличение числа сохранных миелиновых волокон по сравнению с контрольной группой. Оптическая визуализация *ex vivo* показала, что на 28-й день после повреждения спинного мозга у крыс группы ТСМ наблюдалось значительное увеличение сигналов красителя Эванса в эпицентре травмы, где его концентрация была на 84% выше по сравнению с группой ТСМ + ДРеаб ($p < 0,05$). В поясничном отделе (L1-L3) различий в уровне эпифлуоресценции не выявлено, однако в группе ТСМ + ДРеаб отмечалась тенденция к снижению этого показателя. Также обнаружена сильная отрицательная корреляция между показателями повреждения ГСМБ и площадью сохранной ткани в области, приближенной к эпицентру травмы (Th7-Th9), в группе с реабилитацией. Коэффициент корреляции Пирсона составил 0,114, указывая на слабую положительную связь между эпифлуоресценцией и сохранностью ткани, тогда как в группе ТСМ + ДРеаб коэффициент равнялся $-0,761$, что свидетельствует о выраженной отрицательной зависимости между этими переменными.

Таким образом, двигательная реабилитация способствует улучшению сохранности ткани и ГСМБ после ТСМ, однако её влияние на клеточную реактивность астроцитов и синаптические процессы остается ограниченным. Дальнейшие исследования направлены на поиск синергетических эффектов двигательной нагрузки в сочетании с целевой терапией, направленной на модуляцию функций глиальных клеток и синаптической пластичности.

Исследование выполнено за счет средств гранта Российского научного фонда № 23-75-10041 (<https://rscf.ru/project/23-75-10041/>).

Савельев Р.В.¹✉, Скупневский С.В.¹, Чехова А.М.¹, Танделова А.В.¹, Морозова Я.В.^{2,3}

Оценка профилактического действия мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека в модели адъювант-индуцированного ревматоидного артрита у крыс

¹ ФГОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», Владикавказ, Россия

² БУЗ г. Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

³ ФГБУ «НМИЦК им. акад. Е.И. Чазова» Минздрава России, Москва, Россия

✉ 23rodion18@gmail.com

Аннотация. В модели адъювант-индуцированного ревматоидного артрита на крысах линии Wistar выявлен дозозависимый профилактический эффект мононуклеарных клеток пуповинно-плацентарной крови человека (МКППКЧ) в дозировках $4,28 \cdot 10^8$ клеток/кг и $8,57 \cdot 10^8$ кл./кг массы тела.

Ключевые слова: адъювант-индуцированный ревматоидный артрит; мононуклеарные клетки пуповинно-плацентарной крови человека; профилактика артрита.

Saveljev R.V.¹, Skupnevskii S.V.¹, Chekhova A.M.¹, Tandelova A.V.¹, Morozova Ya.V.^{2,3}

Preventive effect of umbilical cord placental blood mononuclear cells in model of adjuvant-induced rheumatoid arthritis in rats

¹ North Ossetian State University, Russian Federation, Vladikavkaz, Russia

² N.V. Sklifosovsky Research Institute of Emergency Medicine, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

³ E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology of Healthcare Ministry of the Russian Federation, Moscow, Russia

Abstract. In the adjuvant-induced arthritis model in Wistar rats a dose-dependent preventive effect of human umbilical-placental blood mononuclear cells was revealed at dosages of 4.28×10^8 cells/kg body weight and 8.57×10^8 cells/kg b.w.

Keywords: adjuvant-induced arthritis; human cord-placental blood mononuclear cells; prevention of arthritis.

Многочисленные доклинические исследования на животных моделях показали, что клеточная терапия может значительно снизить возникновение и прогрессирование модельного экспериментального артрита [1, 2]. В ходе исследования профилактического действия МКППКЧ было использовано 40 самцов крыс линии *Wistar* массой тела 400 ± 20 г, разделенных на равные группы: негативный контроль (физ. раствор), позитивный контроль (подкожное введение полного адъюванта Фрейнда), «опытная×50» и «опытная×100» (внутривенное введение $4,28 \cdot 10^8$ клеток/кг и $8,57 \cdot 10^8$ кл./кг массы тела за 30 дней до индукции артрита). В ходе гистологического исследования относительно «позитивного контроля» были выявлены следующие эффекты: нормализация размеров лимфоидных фолликулов в селезенке, снижение лейкоцитарной инфильтрации в почках, а также значительное уменьшение дегенеративных изменений в суставном аппарате у леченых крыс.

Список литературы

1. Hynes K., Bright R., Proudman S., et al. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cell in experimental arthritis in rat and mouse models: a systematic review // *Semin Arthritis Rheum.* 2016. Vol. 46, N 1. P. 1–19. doi: 10.1016/j.semarthrit.2016.02.008
2. Liu L., Wong C.W., Han M., et al. Meta-analysis of preclinical studies of mesenchymal stromal cells to treat rheumatoid arthritis // *EBioMedicine.* 2019. Vol. 47. P. 563–577. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.08.073

Савченкова И.П. ✉

Мышечные эмбриональные стволовые клетки, чувствительные к вирусу инфекционной анемии лошадей

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия

✉ s-ip@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты по созданию перспективной клеточной модели с заданными свойствами посредством генетической трансформации эмбриональных стволовых клеток мышцы генами рецептора (ELR1) вируса инфекционной анемии лошадей и циклина (eCT1) для проведения фундаментальных биологических исследований.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки мышцы; вирус инфекционной анемии лошадей; рецептор; циклин; генетическая трансформация; чувствительность к вирусу.

Savchenkova I.P.

Murine embryonic stem cells sensitive to equine infectious anemia virus

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV), Moscow, Russia

Abstract. The results of creating a promising cellular model with specified properties through genetic transformation of mouse embryonic stem cells with the genes of the receptor (ELR1) of the equine infectious anemia virus and cyclin (eCT1) for fundamental biological research are presented.

Keywords: mouse; embryonic stem cells; equine infectious anemia virus; receptor; cyclin; genetic transformation; sensitivity to the virus.

В список обязательных отчетных заболеваний, перечисленных Международным бюро эпизоотий Всемирной организации здравоохранения животных, входит инфекционная анемия лошадей (ИНАН), которая наносит существенный экономический ущерб коневодству во всем мире. Возбудитель заболевания — РНК-содержащий вирус, принадлежащий семейству ретровирусов, роду лентивирусов, обладает высокой тропностью к тканевым макрофагам, способным поддерживать его активную репликацию в организме инфицированных лошадей. На поверхности моноцитов и макрофагов лошади был обнаружен рецептор ELR1, а ген *ELR1*, кодирующий этот рецептор, был выделен, клонирован, поставлен под контроль промотора цитомегаловируса и введен в мышечные эмбриональные фибробласты линии NIH 3T3. Наличие данного рецептора на поверхности генетически трансформированных мышечных клеток оказалось достаточно для вторжения лентивируса лошади в мышечные фибробласты *in vitro*. Однако было установлено, что для репликации вируса в этих клетках требуется белок циклин, который кодирует ген циклин T1 лошади (*eCT1*). Мышечные фибробласты с генами *ELR1* и *eCT1* поддерживали репликацию и продукцию вируса в экспериментах в культуре [1]. В отличие от перевиваемых мышечных фибробластов бессмертные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши пролиферируют в культуре с более высокой скоростью (время удвоения 16–18 ч), что делает их перспективным продуцентом рекомбинантных белков [2]. Цель настоящего исследования — оценка чувствительности ЭСК мыши с рекомбинантными генами лошади к вирусу инфекционной анемии лошадей. Ранее мы сообщали о получении мышечных ЭСК с генами рецептора вируса инфекционной анемии (*ELR1*) и циклина T1 (*eCT1*) лошади с помощью электропорации. В результате было получено 27 стабильных генетически трансформированных клонов ЭСК с фенотипом [ELR1eCT1neo]⁺. Встраивание генов в геном клеток

выявляли в ПЦР с геноспецифическими праймерами с последующим нуклеотидным секвенированием, используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из клеток. Экспрессия генов *ELR1* и *eCT1* лошади в ЭСК была подтверждена на уровне транскрипции по наличию мРНК целевых генов в реакции ОТ-ПЦР [3]. Представляло интерес изучить чувствительность измененных генетической трансформацией клеток к вирусу. Для заражения ЭСК вирусом ИНАН использовали лизат печени экспериментально зараженной лошади. Инфицирование клеток проводили в 25 см² флаконах посредством замены питательной среды на 1 мл суспензии лизата печени лошади. Инокулум оставляли на 2 ч для адсорбции вируса на клетках, затем удаляли и культуру промывали. После внесения поддерживающей среды в объеме, составляющем 10% от емкости культурального флакона, культуру помещали в инкубатор с 5% CO₂ при температуре 37°C. Для контроля использовали неинфицированные ЭСК. После заражения клетки лизировали замораживанием при –20°C, лизат использовали для дальнейшего инфицирования. Чувствительность ЭСК к вирусу ИНАН лошадей оценивали с помощью иммуноцитохимического анализа. Для этого клетки культивировали и заражали на покровных стеклах. В качестве первых антител (АТ) использовали поликлональные АТ лошади против антигена (АГ) р26 вируса ИНАН лошади. Вторые кроличьи АТ были против Ig лошади, меченные ФИТЦ. Экспрессию вирусного АГ в клетках анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Carl Zeiss (длина волны 480 нм). Морфологических изменений в зараженных культурах не было выявлено в течение всего периода наблюдения (48 сут). Наши результаты показывают, что заражение мышинных ЭСК с рекомбинантными генами лошади в геноме вирусом ИНАН лошадей не замедляет рост клеток и не ведет к их гибели. Окраска клеток АТ против АГ р26 (негликозилированный белок капсида СА) вируса ИНАН выявила наличие клеток, в которых наблюдалась экспрессия вирусного АГ. В контрольных группах окрашенных клеток не обнаружено АГ вируса. Таким образом, можно предположить, что ЭСК мыши с генами рецептора вируса инфекционной анемии (*ELR1*) и циклина Т1 (*eCT1*) лошади приобретают чувствительность к вирусу инфекционной анемии лошадей в процессе генетической трансформации, что делает их перспективным материалом для репродукции вируса. Это необходимо для проведения фундаментальных медико-биологических исследований, связанных с безопасностью как животных, так и человека, а также для производства вакцин, антигенов, диагностических препаратов.

Список литературы

1. Zhang B., Montelaro R.C. Replication of equine infectious anemia virus in engineered mouse NIH 3T3 cells // *J Virol*. 2009. Vol. 83, N 4. P. 2034–2037. doi: 10.1128/JVI.01883-08
2. Савченкова И.П., Алексеенкова С.В., Юров К.П. Эмбриональные стволовые клетки мыши — перспективный материал для изучения вируса инфекционной анемии лошадей *in vitro* и *in vivo* // *Вопросы вирусологии*. 2016. Т. 61, № 3. С. 107–111. EDN: WEEYPP doi: 10.18821/0507-4088-2016-61-3-107-111
3. Savchenkova I.P., Savchenkova E.A., Osipova Y.A. Murine embryonic stem cells with equine genes // *AIP Conference Proceedings*. 2022. Vol. 2467, N 1. doi: 10.1063/5.0092606

Савченкова И.П. ✉

Стволовые клетки животных — перспективный материал для развития коллекции культур клеток

ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, Москва, Россия

✉ s-ip@mail.ru

Аннотация. Представлены результаты по развитию Специализированной Коллекции Перевиваемых Клеточных Культур сельскохозяйственных и промысловых животных посредством депонирования в нее клеток со свойствами стволовых для создания новых клеточных моделей с заданными свойствами для фундаментальных и прикладных исследований в биологии и биотехнологии.

Ключевые слова: сельскохозяйственные животные; мелкие домашние животные; культура клеток; стволовые клетки; паспортизация; стандартизация; депонирование; коллекция; развитие.

Savchenkova I.P.

Stem cells as a perspective material for development of mammalian cell culture collection

Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV", Moscow, Russia

Abstract. The results of the development of a Specialized Collection of Continuous Cell Cultures of agricultural and commercial animals by depositing cells with stem properties into it to create new cell models with specified properties for fundamental and applied research in biology and biotechnology are presented.

Keywords: farm animals; small domestic animals; cell culture; stem cells; certification; standardization; deposit; collection; development.

В 1996 г. профессором Л.П. Дьяконовым была создана Специализированная Коллекция Перевиваемых Клеточных Культур сельскохозяйственных и промысловых животных РККК(П), СХЖ РАСХН [1], а в 2008 г. с приходом в отдел профессора В.Т. Какпакова к ней присоединилась Коллекция беспозвоночных [2]. Коллекции клеточных культур — это фундаментальная основа научных исследований по биологии клетки и биотехнологии. Одной из ее задач является пополнение новыми культурами клеток с уникальными свойствами, которыми обладают стволовые клетки (СК). СК млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, являются перспективным материалом для создания новых клеточных систем с заданными свойствами посредством направленной дифференцировки и/или генетической трансформации *in vitro*. Такие клеточные модели позволят ответить на многие фундаментальные вопросы, касающиеся биологии СК, роли рецепторов, клеточной пролиферации и степени дифференцировки в тропизме вирусов и других патогенов, для биопроизводства вакцин и диагностикумов. Кроме того, криоконсервация генетического материала одновременно с разработкой методов биологии развития являются основными способами сохранения биоразнообразия, наряду с выделением охраняемых территорий и искусственным разведением животных в зоопарках, питомниках, на фермах. Сотрудниками лаборатории выделены и изучены свойства мезенхимных стволовых/стромальных клеток (МСК) сельскохозяйственных и мелких домашних животных, которые депонированы в коллекцию согласно требованиям, предъявляемым к коллекционному материалу для обеспечения исследователя качественным, охарактеризованным на современном методическом уровне в соответствии с общепринятыми требованиями (паспортом) [3]. За последние 10 лет в Коллекцию депонированы: МСК, выделенные из жировой ткани (ЖТ) крупного рогатого скота (крс), коллекционный № 80,

овец МСК(ЖТ) № 100, лошадей МСК(ЖТ) № 97, собак МСК(ЖТ) № 93, кошек МСК(ЖТ) № 91 и из костного мозга (КМ) крс МСК(КМ) коллекционный № 79, овец МСК(КМ) № 95, а также из пуповинной крови лошадей МСК(ПК) № 94. На некоторые из вышеперечисленных культур получены патенты. В лаборатории разработаны методы по выделению ранних половых клеток из тестикул хряков и их поддержанию в культуре, что может способствовать сохранению генома высокопродуктивных, редких и исчезающих видов животных. Получены эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, которые имеют уникальные свойства и признаки, схожие с ранними эмбрионами. ЭСК млекопитающих и представляют собой перспективную клеточную модель *in vitro* для разработки новых фармакологических и токсикологических скрининговых систем, что объективно позволит в ближайшее время сократить эксперименты на животных [4]. Адаптация мышинных ЭСК посредством генетической трансформации этих клеток позволит создать новые лабораторные модели для изучения молекулярных механизмов патогенеза сложных инфекций и иммунного ответа на них. Имеет значение также разработка методов, позволяющих сохранить жизнеспособность клеточного материала не только во время хранения, но и во время его транспортировки, с целью защитить клетки от травм и колебаний температур, которые неизбежны при почтовых перевозках и пересылках, а также свести к минимуму риск утечек клеточного материала [5]. Таким образом, СК млекопитающих, в том числе сельскохозяйственных животных, являются перспективным материалом для создания новых клеточных систем с заданными свойствами *in vitro*, в связи с чем получение культур СК и их депонирование в коллекцию является одним из приоритетных направлений в развитии биоветеринарных технологий на современном этапе.

Список литературы

1. Дьяконов Л.П., Гальнбек Т.В., Акиншина Г.Т., и др. Каталог клеточных культур животных. 2-е изд. Москва, 2006. 115 с.
2. Гулюкин М.И., Дьяконов Л.П., Какпаков В.Т., и др. Каталог клеточных культур позвоночных и беспозвоночных животных. 3-е изд. Москва: ГНУ ВИЭВ, 2011. 185 с. EDN: YMGDUT
3. Савченкова И.П., Волкова И.М., Викторова Е.В., и др. Дополнительная информация к каталогу Специализированной Коллекции перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных и промысловых животных при ГНУ ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко (СХЖ РАСХН). Сектор стволовой клетки. Москва: Спутник+, 2012. 6 с. EDN: VVPSIB
4. Савченкова И.П. Эмбриональные стволовые клетки млекопитающих — новая клеточная модель для оценки эмбриотоксичности // Биозащита и биобезопасность. 2013. Т. 5, № 3(16). С. 44–49. EDN: RVKBWN
5. Савченкова И.П., Коровина Д.Г., Васильева С.А. Желатинизация как метод защиты клеток млекопитающих // Биотехнология. 2016. Т. 32, № 4. С. 31–37. EDN: WMWDIR doi: 10.1016/0234-2758-2016-32-4-31-37

Садовская А.В.^{1,2} ✉, Петинати Н.А.¹, Дризе Н.И.¹, Васильева А.Н.¹, Алешина О.А.¹, Паровичникова Е.Н.¹

Нарушения метаболизма в мультипотентных мезенхимных стромальных клетках костного мозга больных острыми лейкозами в дебюте заболевания и по мере лечения

¹ ФГБУ НМИЦ гематологии Минздрава России, Москва, Россия

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

✉ sadovskaya.sasha@gmail.com

Аннотация. Свойства мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) зависят от их окислительно-восстановительного баланса и митохондриальной активности. В МСК из костного мозга больных в дебюте и ремиссии острого лейкоза снижена экспрессия нескольких генов, участвующих в регуляции биогенеза митохондрий.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; острые лейкозы; митохондрии; экспрессия генов; ядерная и митохондриальная ДНК.

Sadovskaya A.V.^{1,2}, Petinati N.A.¹, Drize N.I.¹, Vasilyeva A.N.¹, Aleshina O.A.¹, Parovichnikova E.N.¹

Metabolic disorders in the bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells of patients with acute leukemia at the onset of the disease and during treatment

¹ National Medical Research Center for Hematology, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Properties of multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) depend on redox balance and mitochondrial activity. In MSCs from the bone marrow of patients at the onset and in remission of acute leukemia, expression of several genes involved in the regulation of mitochondrial biogenesis is reduced.

Keywords: multipotent mesenchymal stromal cells; acute leukemia; mitochondria; gene expression; nuclear and mitochondrial DNA.

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) — необходимый компонент костномозговых ниш гемопоэтических стволовых клеток. МСК дают начало различным клеткам стромы — фибробластам, остеобластам, адипоцитам и др. Все эти клетки, паракринно секретируемые ими белки и внеклеточные везикулы обеспечивают и регулируют стволовые кроветворные клетки, их пролиферацию и дифференцировку. У больных острым лейкозом (ОЛ) микроокружение костного мозга изменяется в результате взаимодействия со злокачественными клетками и химиотерапии. Функциональные свойства МСК, такие как дифференцировка, регуляция кроветворения и иммунного ответа, зависят от окислительно-восстановительного баланса и митохондриальной активности МСК. Митохондрии сильно влияют на функциональность МСК и могут служить потенциальной мишенью различных методов лечения. Цель работы — изучить изменения метаболической и антиоксидантной активности МСК больных ОЛ в дебюте и ремиссии заболевания. МСК были получены из костного мозга 34 пациентов (13 с острым лимфобластным лейкозом — ОЛЛ, 21 с острым миелоидным лейкозом — ОМЛ; 11 мужчин, 23 женщины; средний возраст 35,5 лет) в дебюте и в период ремиссии ОЛ и 65 здоровых доноров соответствующего возраста после подписания информированного согласия. МСК культивировали стандартными методами в условиях нормального содержания кислорода, тогда как микроокружение костного мозга физиологически гипоксично. Соотношение между митохондриальной

ДНК (мтДНК) и ядерной ДНК (ядДНК), позволяющее оценить относительную массу митохондрий, изучали методом мультиплексной ПЦР в реальном времени. Относительные уровни экспрессии (ОУЭ) нескольких генов, связанных с антиоксидантной активностью и биогенезом митохондрий, исследовали с помощью ПЦР в реальном времени. МСК пациентов с ОЛ как в начале, так и в ремиссии заболевания имели достоверно сниженную экспрессию генов: HIF1A ($1,32 \pm 0,15$ в МСК доноров; $0,83 \pm 0,14$ в МСК больных в дебюте и $0,82 \pm 0,1$ в ремиссии); LDHA ($1,9 \pm 0,19$ в МСК доноров; $1,2 \pm 0,18$ в МСК больных в дебюте и $1,3 \pm 0,16$ в ремиссии), NQO1 ($1,92 \pm 0,16$ в МСК доноров; $1,3 \pm 0,18$ в МСК больных в дебюте и $1,25 \pm 0,18$ в ремиссии) и H01 ($4,45 \pm 0,48$ в МСК доноров; $2,13 \pm 0,51$ в МСК больных в дебюте и $2,4 \pm 0,62$ в ремиссии) по сравнению с донорскими МСК. Снижение NFE2L2 в МСК пациентов не было статистически значимым ($2,63 \pm 0,18$ в МСК доноров; $2,08 \pm 0,17$ в МСК больных в дебюте и $2,09 \pm 0,17$ в ремиссии). В ремиссии заболевания достоверно снижается уровень экспрессии PGC1A ($0,035 \pm 0,01$ в МСК доноров; $0,011 \pm 0,005$ в ремиссии $0,005 \pm 0,002$ в ремиссии). Различий в соотношении мтДНК/ядДНК не наблюдалось. Пониженные ОУЭ NQO1 и H01 могут привести к повреждению клеток активными формами кислорода. Снижение ОУЭ HIF1A, NQO1 и H01 характерно для стареющих клеток, и фенотип МСК пациентов с ОЛ аналогичен фенотипу стареющих клеток. Антиоксидантная способность МСК пациентов не улучшается, а даже ухудшается после достижения ремиссии. МСК больных ОЛ по своему метаболическому статусу отличаются от МСК здоровых доноров. Хотя соотношение мтДНК/ядДНК в МСК больных ОЛ не отличается от МСК здоровых доноров, функционирование митохондрий и антиоксидантной системы изменено. Антиоксидантная способность МСК больных ОЛ нарушена; возможно, пациентам будут полезны добавки с антиоксидантами.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 22-15-00018, <https://rscf.ru/project/22-15-00018/>.

Салова А.В.¹ ✉, Беляева Т.Н.¹, Литвинов И.К.¹, Корнилова Е.С.^{1,2}

Влияние закисления на динамику эндоцитоза рецептора ЭФР в мезенхимных стромальных клетках человека

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ avsalova@gmail.com

Аннотация. Эндоцитоз рецептора ЭФР в МСК отличается от классической схемы (клетки HeLa) увеличенным числом формирующихся эндосом, только часть которых вступает в EEA1-зависимый цикл деградации. Мы предполагаем, что это связано с особенностями закисления эндосом в МСК.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки человека; рецептор эпидермального фактора роста; эндоцитоз; закисление эндосом; бафиломидин А1.

Salova A.V.¹, Belyaeva T.N.¹, Litvinov I.K.¹, Kornilova E.S.^{1,2}

Effect of acidification on the dynamics of EGF receptor endocytosis in human mesenchymal stromal cells

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Endocytosis of the EGF receptor in MSCs differs from the classical scheme (HeLa cells) by an increased number of formed endosomes, only part of which enters the EEA1-dependent degradation cycle. We assume that this is due to the peculiarities of endosome acidification in MSCs.

Keywords: human mesenchymal stromal cells; epidermal growth factor receptor; endocytosis; endosome acidification; bafilomycin A1.

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют большой интерес для клеточной терапии из-за их способности к самообновлению и дифференцировке, а также секреции цитокинов и сигнальных гормонов, в частности, с ангиогенными и антиапоптотическими эффектами. Предполагается, что в этих процессах существенную роль играет рецептор эпидермального фактора роста (РЭФР). В связи с этим важно понять особенности его эндоцитоза в этих клетках. Считается, что основным механизмом интернализации РЭФР после связывания с лигандом является клатрин-опосредованный эндоцитоз, при котором рецептор попадает с поверхности клеточной мембраны через ямки, покрытые клатрином, в эндоцитозные пузырьки и доставляется в ранние эндосомы. Отсюда рецептор может либо рециклировать на поверхность клетки, либо переноситься дальше, направляясь для деградации в поздние эндосомы и лизосомы. В ходе эндоцитоза в процессе созревания эндосом происходит постепенное закисление их внутреннего пространства. Люминальный pH важен для сортировки эндоцитированных грузов, он регулирует деградацию белков в лизосомах и способствует трансмембранной протондвижущей силе, которая управляет транспортом различных органических и неорганических растворенных веществ в/из эндосомы. Основным механизмом закисления везикул эндосомного аппарата является работа АТФ-зависимой протонной помпы, известной как вакуолярная H⁺-АТФаза (V1/V0-АТФаза). Данные, затрагивающие эндоцитоз в МСК, в настоящий момент недостаточно представлены в литературе, что делает данное исследование особенно актуальным. В настоящей работе был охарактеризован эндоцитозный трафик лиганда РЭФР. Стимуляция эндоцитоза осуществлялась методом импульсного введения ЭФР (8 нМ), меченного квантовыми точками, в клетки МСК.

Были проанализированы такие параметры, как число эндосом, их яркость и эффективность кластеризации эндосом в околядерной области. Эти параметры были сопоставлены с данными по эндоцитозу РЭФР в опухолевых клетках HeLa, отражающими классические представления о протекании эндоцитоза РЭФР. Было обнаружено, что при стимуляции эндоцитоза РЭФР в МСК количество ранних эндосом в расчете на клетку существенно выше, чем в HeLa, в ходе эндоцитоза вследствие слияний их число со временем уменьшается в обеих линиях, но в МСК число эндосом снижается медленнее. При этом в клетках МСК яркость эндосом значительно ниже по сравнению с HeLa и увеличивается лишь на небольшую величину к 90 мин, тогда как в клетках HeLa к 30 мин она достигает максимума, а затем снижается, что объясняется динамикой слияний эндосом. Такие различия можно связать как с изначально меньшими размерами эндосом и их меньшей яркостью в клетках МСК, так и с наличием гетерогенности этих параметров, отражающих возможное существование в клетках МСК нескольких фракций эндосом, различающихся по внутриклеточной судьбе. Методом иммунофлуоресцентного анализа с использованием антител на ранние (Rab5, EEA1), поздние и мультивезикулярные эндосомы (Rab7, CD63) и лизосомы (Lamp1) в клетках МСК и HeLa были количественно охарактеризованы стадии эндоцитоза с помощью подсчета коэффициента колокализации Мандерса РЭФР-содержащих структур с этими маркерами. Анализ иммунофлуоресцентных изображений показал, что в МСК, по сравнению с HeLa, незначительная доля эндоцитозных пузырьков вступает в канонический EEA1-зависимый цикл, приводящий к быстрой деградации через поздние эндосомы и лизосомы. Тем не менее в конечном итоге все РЭФР деградируют в лизосомах. Исследуя роль закисления в регуляции эндоцитоза РЭФР, мы показали, что предварительная инкубация клеток с ингибитором протонной помпы Бафиломицином А1 (BafA1, 100 нМ) с его присутствием в среде в течение всего эксперимента не блокировала эндоцитоз, а приводила к замедлению формирования гибридных ранних эндосом с EEA1, ассоциации и последующей диссоциации с Rab7, снижению ассоциации с CD63, замедлению последующей колокализации с Lamp1, как в HeLa, так и в МСК. Наиболее выраженный эффект действия BafA1 наблюдался на ранних стадиях эндоцитоза, при этом в HeLa замедлялась ассоциация эндосом с EEA1 без достижения максимальной величины коэффициента колокализации Мандерса, а в МСК происходило не только замедление этого процесса, но и существенный рост коэффициента Мандерса. Тем не менее, несмотря на повышение pH в эндосомах и замедление начальных этапов эндоцитоза и наблюдаемых изменений на последующих стадиях, в конечном итоге РЭФР достигает лизосом. Эти данные находятся в соответствии с полученными данными по общему числу эндосом, вовлеченных в эндоцитоз. Таким образом, эндоцитоз РЭФР в МСК сходен с классическими представлениями, однако выявлены такие особенности, как большее число формирующихся эндосом после стимуляции эндоцитоза с меньшим количеством лиганда, из которых только половина вступает в EEA1-зависимый цикл деградации в лизосомах. Анализ влияния BafA1 на эндоцитоз РЭФР в МСК указывает на возможные отличия в степени закисления эндолизосом.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00335.

Самойлова Е.М.^{1,2}✉, Дашинимаев Э.Б.³, Снежкина А.В.², Кудряшова О.М.¹,
Кондратьев Н.В.⁴, Баклаушев В.П.^{1–3}

Инициальные механизмы, определяющие эффективность прямого репрограммирования соматических клеток в пронеурональном направлении (по данным RNAseq)

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Научный центр психического здоровья, Москва, Россия

✉ samoyket@gmail.com

Аннотация. Охарактеризованы транскрипционные изменения, вызванные факторами репрограммирования NGN2, ASCL1, SOX2 и MSI1 на 5-й день перепрограммирования. Из всех факторов наибольший эффект оказали NGN2 и MSI1, инфицировав образование широкого спектра клеток нейрального ряда.

Ключевые слова: прямое репрограммирование; РНК-секвенирование; ЦНС; нервные стволовые клетки; нейроны; астроциты; олигодендроциты; REST1; фибробласты.

Samoilova E.M.^{1,2}, Dashinimaev E.B.³, Snezhkina A.V.², Kudryashova O.M.¹,
Kondratyev N.V.⁴, Baklaushev V.P.^{1–3}

Initial mechanisms determining the efficiency of direct reprogramming of somatic cells in the proneuronal direction (according to RNAseq data)

¹ Federal Center for Brain and Neurotechnologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Scientific Center for Mental Health, Moscow, Russia

Abstract. Transcriptional changes induced by reprogramming factors NGN2, ASCL1, SOX2 and MSI1 on day 5 of reprogramming are characterized. Of all the factors, NGN2 and MSI1 had the greatest effect, infecting the formation of a wide range of neural cells.

Keywords: direct reprogramming; RNA sequencing; CNS; neural stem cells; neurons; astrocytes; oligodendrocytes; REST1; fibroblasts.

Восстановление центральной нервной системы (ЦНС) после травм и заболеваний является одной из самых сложных задач современной медицины. Связано это, в первую очередь, с тем, что способность к истинной регенерации во взрослой ЦНС исчезающе низка и восстановление происходит только за счет нейрональной пластичности. Одной из альтернативных технологий восстановления ЦНС является регенеративная клеточная терапия с помощью репрограммированных соматических клеток. Прямое пронеурональное репрограммирование клеток является современной альтернативой использованию дорогих и нестабильных ИПСК в клеточной терапии. Этот подход дешевле, занимает меньше времени и более безопасен, чем применение производных ИПСК, но и у него есть свои недостатки. Механизмы прямого репрограммирования крайне чувствительны к условиям среды и большому количеству факторов, что делает эту технологию сложно воспроизводимой. Бытылочным горлышком проблемы создания воспроизводимого

протокола прямого репрограммирования является начальный этап, когда в клетке под действием внешних транскрипционных факторов стохастически активируется тот или иной паттерн экспрессии, определяющий клеточную идентичность. Понимание механизмов и тенденций раннего стохастического этапа, с нашей точки зрения, позволит с большей точностью прогнозировать конечный фенотип клеток и таким образом стандартизировать репрограммирование. В данной работе мы исследовали влияние четырех пронеурональных репрограммирующих факторов ASCL1, SOX2, NGN2 и MSI1 на транскриптом соматической клетки в процессе прямого пронеуронального репрограммирования на раннем этапе.

В результате эксперимента было показано, что из четырех выбранных факторов NGN2 и MSI1 наиболее активно иницируют первичный этап прямого пронеуронального репрограммирования, в результате чего клетки приобретают пронеурональный фенотип уже к 5-му дню репрограммирования. С помощью RNAseq и последующего биоинформатического анализа были определены инициальные механизмы смены клеточной идентичности. В нашем исследовании наборы генов, активируемых различными репрограммирующими факторами, почти не перекрывались, хотя 18 подавленных и 32 активированных гена были общими для LF1-MSI1 и LF1-NGN2. Примечательно, что в LF1-NGN2 наблюдалось не только повышение, но и снижение экспрессии значительного числа генов, среди которых преобладали гены, кодирующие провоспалительные белки, белки-шапероны, супрессоры опухолей и белки межклеточных контактов. Среди генов, различно экспрессирующихся у NGN2 и MSI1, были гены, входящие в один из главных противонейрональных каскадов клетки: сигнальный каскад REST1. Так, оверэкспрессия NEUROG2 по конкурентному механизму подавила активность самого фактора REST1, но не его основных кофакторов, а оверэкспрессия MSI1 — наоборот. В результате эктопическая экспрессия NGN2 привела к формированию широкого спектра пронеурональных субпопуляций, в то время как воздействие MSI1 сформировало устойчивую субпопуляцию клеток радиальной глии. Полученные данные в дальнейшем позволят стандартизировать технологию прямого пронеуронального репрограммирования путём оптимизации последовательности воздействия транскрипционных факторов в многокомпонентных протоколах.

Сарыглар Р.Ю. ✉, Лупатов А.Ю., Ярыгин К.Н.

Иммуносупрессивное действие МСК из микроокружения солидных опухолей на клетки адаптивного иммунитета

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

✉ roza_saryglar@mail.ru

Аннотация. Первичные культуры клеток, полученные из ткани рака молочной железы и колоректального рака, имели фенотип МСК и схожее влияние на аллогенные иммунные клетки при их совместном культивировании. МСК подавляли дифференцировку дендритных клеток (ДК) и пролиферацию лимфоцитов, не влияли на созревание ДК.

Ключевые слова: опухолевое микроокружение; МСК; рак молочной железы; колоректальный рак; дендритные клетки; лимфоциты; иммуносупрессия; опухолевая строма.

Saryglar R.Yu., Lupatov A.Yu., Yarygin K.N.

Immunosuppressive effect of MSCs from the solid tumor microenvironment on cells of adaptive immunity

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Abstract. Primary culture cells derived from breast and colorectal cancer tissue had a MSCs phenotype and had a similar effect on allogeneic immune cells in co-culture. MSCs suppress dendritic cell (DC) differentiation and lymphocyte proliferation without affecting low DC.

Keywords: tumor microenvironment; MSCs; breast cancer; colorectal cancer; dendritic cells; lymphocytes; immunosuppression; tumor stroma.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются мультипотентными клетками, которые участвуют в структурном и функциональном поддержании соединительных тканей при нормальном гомеостазе. Однако в контексте рака МСК все чаще признаются важным стромальным компонентом, участвующим в развитии опухоли [1, 2]. В этом исследовании мы оценили способность МСК опухолевой стромы рака молочной железы и колоректального рака влиять *in vitro* на критические механизмы адаптивного иммунитета, а именно на дифференцировку моноцитов в дендритные клетки (ДК), созревание ДК и антиген-индуцированную пролиферацию Т-лимфоцитов.

Мононуклеарную фракцию клеток получали из периферической крови здоровых доноров путем седиментации в градиенте плотности фикола. Для культивирования использовали среду RPMI-1640, включающую 10% ЭТС, 50 мкг/мл гентамицина, 5 мМ буфера HEPES и 100 мг/мл пирувата. Для индукции дифференцировки моноцитов в ДК добавляли рекомбинантные цитокины: 80 нг/мл гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и 50 нг/мл IL-4. Эффективность дифференцировки оценивали цитометрически на 5-е сутки по экспрессии маркера ДК CD1a и исчезновению маркера моноцитов CD14. Для стимуляции созревания ДК добавляли бактериальный ЛПС. Степень зрелости ДК оценивали через 48 ч по наличию экспрессии костимулирующей молекулы CD83 на фоне увеличения экспрессии HLA-DR. Лимфоциты стимулировали к пролиферации фитогемагглютинин. Непосредственно перед сокультивированием лимфоциты окрашивали внутриклеточным флуоресцентным красителем CFSE. Пролиферативную способность лимфоцитов оценивали цитометрически по распределению CFSE между дочерними клетками на 4-е сутки. Для получения МСК из стромы рака молочной железы и колоректального рака использовали опухолевый

материал от трех и четырех пациентов с гистологически подтвержденным диагнозом соответственно. Опухолевую ткань подвергали ферментативной обработке коллагеназой I и IV типов и культивировали при 37°C, 5% CO₂ в питательной среде DMEM/F-12, содержащей L-глутамин, 10% ЭТС, антибиотик-антимикотик 100X. Для цитометрического анализа клетки окрашивали моноклональными антителами к поверхностным маркерам, конъюгированными с флуорохромами в PBS, содержащем 1% FBS и 0,05% азида натрия в течение 30 мин при 4°C. Обработка результатов производилась в FlowJo™ Software Version 10.7. Для иммуноцитохимического анализа культуры клеток инкубировали с первичными моноклональными антителами против Fibroblast Activation Protein (FAP), Тенасцина С (TsC) и гладкомышечного актина (SMA), CD24 после чего отмывали и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентным красителем DyLight 488, ядра докрашивали раствором DAPI. Данные рассчитывались как среднее±стандартное отклонение, различия считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Культуры, полученные из рака молочной железы и колоректального рака, имели схожую с фибробластами морфологию и экспрессировали поверхностные молекулы, характерные для мезенхимных стромальных клеток: CD73, CD90, CD105, CD44, при отсутствии экспрессии маркеров гемопоэтических (CD14, CD45, CD11b, CD31), эпителиальных (EpCAM, CD24) клеток и макрофагов (CD68). Клетки не экспрессировали костимулирующие молекулы (CD80, CD83, CD86) и молекулы главного комплекса гистосовместимости II-класса HLA-DR. Также не было выявлено заметных различий в уровне экспрессии HLA-ABC и рецептора фактора некроза опухолей CD95. Результаты иммуноцитохимического исследования показали высокую экспрессию белка активации фибробластов (FAP), тенасцина С и α -SMA в клетках из обоих источников. Результаты цитотипирования свидетельствовали о стромальном происхождении и активированном состоянии полученных клеток. Исследование функциональных свойств полученных культур выявило их способность подавлять дифференцировку ДК из моноцитов, а также пролиферацию Т-лимфоцитов. При этом они не оказывали существенного влияния на созревание ДК. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МСК опухолевой стромы рака молочной железы и колоректального рака обладают супрессорным эффектом на важные элементы формирования адаптивной иммунорезистентности и могут быть вовлечены в процесс ухода опухоли от иммунологического контроля. Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800499-5).

Список литературы

1. Hazrati A, Malekpour K, Mirsanei Z, et al. Cancer-associated mesenchymal stem/stromal cells: role in progression and potential targets for therapeutic approaches // *Front Immunol*. 2023. Vol. 14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1280601.
2. Lupatov A.Y., Saryglar R.Y., Vtorushina V.V., et al. Mesenchymal stromal cells isolated from ectopic but not eutopic endometrium display pronounced immunomodulatory activity *in vitro* // *Biomedicines*. 2021. Vol. 9, N 10. P. 1286. doi: 10.3390/biomedicines9101286

Сафарова Д.Д.¹ ✉, Смирнова Д.В.¹, Переpletчикова Д.А.¹, Карагяур М.Н.², Малашичева А.В.¹

Иммортализация гингивальных фибробластов человека: получение стабильных клеточных линий

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ safarovadasha07@gmail.com

Аннотация. Данная работа посвящена созданию immortalized линии гингивальных фибробластов человека с помощью трансдукции лентивирусом, несущим ген hTERT. Полученная линия клеток сохраняет способность к дифференцировке в остеогенном направлении, аналогичную первичным клеткам. Это делает её ценным инструментом для изучения остеогенной дифференцировки и разработки новых терапевтических подходов.

Ключевые слова: immortalization; репликативное старение клеток; гингивальные фибробласты; hTERT.

Safarova D.D.¹, Smirnova D.V.¹, Perepletchikova D.A.¹, Karagyaur M.N.², Malashicheva A.V.¹

Immortalization of human gingival fibroblasts: obtaining stable cell lines

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Regenerative Medicine, Medical Scientific and Educational Center, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. This study is dedicated to the development of an immortalised human gingival fibroblast cell line through transduction with a lentiviral vector carrying the hTERT gene. This cell line retains the capacity for osteogenic differentiation, similar to that of primary cells, making it a valuable resource for investigating osteogenic differentiation processes and exploring novel therapeutic strategies.

Keywords: immortalization; cell replicative senescence; gingival fibroblasts; and hTERT.

Первичные гингивальные фибробласты человека представляют собой ценный ресурс для регенеративной медицины, обладающий значительным потенциалом для восстановления тканей. Их способность к дифференцировке в остеогенном, адипогенном и хондрогенном направлениях делает их перспективным материалом для персонализированной медицины и биомедицинских исследований.

Однако, как и другие первичные клетки, гингивальные фибробласты имеют ограниченный срок жизни *in vitro*. Количество пассажей, которое можно выполнить с первичными клетками, зависит от ряда факторов, включая источник клеток, условия культивирования и конечную цель их использования. Биологические процессы, такие как укорочение теломер и клеточная сенесценция, ограничивают количество делений, которые может пройти первичная клетка.

Для преодоления этой проблемы в научном сообществе широко применяют immortalized клеточные линии. Immortalized клетки обладают неограниченным потенциалом к делению, что делает их незаменимым инструментом для изучения клеточных процессов, моделирования заболеваний, тестирования лекарственных препаратов и разработки новых терапевтических подходов.

Цель данной работы заключалась в получении стабильной immortalized линии гингивальных фибробластов человека, способной сохранять ключевые свойства первичных клеток.

Для создания immortalized линии первичные гингивальные фибробласты человека, полученные из десны, были трансдуцированы лентивирусными частицами, несущими ген каталитического компонента человеческой теломеразы (hTERT).

Лентивирусные частицы, используемые для трансдукции, были собраны на основе плазмиды pVLT-EF1a-hTERT-puroR. Плазида также содержит ген резистентности к пурамицину, который используется как селективный маркер для отбора клонов, успешно трансдуцированных лентивирусом. После трансдукции клетки культивировали в присутствии пурамицина. Концентрация пурамицина (0,7–1 мкг/мл) была подобрана таким образом, чтобы обеспечить эффективную селекцию трансдуцированных клеток без негативного влияния на их жизнеспособность.

Для оценки потенциала immortalized клеток к дифференцировке в остеогенном направлении клетки культивировали с добавлением специфических индукторов остеогенной дифференцировки факторов каждые 5–10 пассажей. Степень дифференцировки оценивали методом окраски ализариновым красным, который позволяет визуализировать образование минерализованного матрикса. Результаты показали, что immortalized линии гингивальных фибробластов демонстрируют сопоставимый с первичными клетками остеогенный потенциал. Методом световой микроскопии было подтверждено, что immortalized линии сохраняют свою типичную морфологию, характерную для гингивальных фибробластов. Дополнительно была проведена количественная оценка экспрессии генов-маркеров Vimentin, Runx2, TGF β , COL1A1, ALPL, VCLAP и ACTA2 методом ПЦР в реальном времени, которая также подтвердила сходство уровней экспрессии в первичных и immortalized гингивальных фибробластах.

Таким образом, была получена стабильная линия immortalized гингивальных фибробластов, сохраняющая способность к дифференцировке в остеогенном направлении. Данная линия клеток является ценным инструментом для дальнейших исследований, направленных на изучение механизмов остеогенной дифференцировки, а также может быть использована для разработки новых терапевтических подходов к лечению заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ проекта 23-15-00320).

Сафарян С.М.¹ ✉, Нифонтова Г.О.¹, Ефремов Ю.М.¹, Зубанова Е.М.², Голубева Е.Н.², Костюк С.В.^{1,3}, Березянка И.А.^{1,3}, Шпичка А.И.¹, Тимашев П.С.¹

Дизайн и характеристика раневых покрытий на основе термочувствительных полимерных наногелей

¹ Институт регенеративной медицины Сеченовского университета, Москва, Россия

² Химический факультет Московского государственного университета, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

✉ safaryan.sofi@yandex.ru

Аннотация. В работе описываются структура, стабильность и физико-химические свойства наногеля на основе поли-N-изопропилакриламида (пНИПАМ) с температурным переходом в пределах от 30 до 40°C. Рассматривается использование полимера в качестве матрицы для контролируемой доставки лекарств при лечении ожогов.

Ключевые слова: пНИПАМ; термочувствительный полимер; раневые повязки; лечение ожогов; доставка лекарств; регенерация тканей.

Safaryan S.M.¹, Nifontova G.O.¹, Efremov Y.M.¹, Zubanova E.M.², Golubeva E.N.², Kostyuk S.V.^{1,3}, Berezyanko I.A.^{1,3}, Shpichka A.I.¹, Timashev P.S.¹

Design and characterization of wound dressings based on thermosensitive polymer nanogels

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² Faculty of Chemistry, Moscow State University, Moscow, Russia

³ Research Institute of Physico-Chemical Problems, Belarusian State University, Minsk, Belarus

Abstract. The paper describes the structure, stability and physicochemical properties of a nanogel based on poly-N-isopropylacrylamide (pNIPAM) with a temperature transition in the range from 30 to 40 °C. The use of the polymer as a matrix for controlled drug delivery in the treatment of burns is considered.

Keywords: pNIPAM; thermosensitive polymer; wound dressings; burn treatment; drug delivery; tissue regeneration.

Поражения кожи, такие как раны и ожоги, являются актуальной проблемой медицины. При лечении ожогов критически важным является не только эффективность и скорость заживления, но и профилактика раневых инфекций. Во многом это определяется выбором оптимальных раневых покрытий. Классические раневые покрытия и бинты не имеют важных для эффективного заживления активных свойств, таких как антибактериальные, обезболивающие, противовоспалительные и другие. Таким образом, возникает потребность в новых функциональных раневых покрытиях с активными свойствами для лечения кожных повреждений, в частности ран и ожогов, которые отвечали бы обозначенным выше требованиям.

Предложенный нами подход заключается в создании раневых покрытий на основе термочувствительных наногелей с контролируемым стимул-чувствительным переходом для доставки терапевтических агентов на разных стадиях заживления ран. Известно, что локальная температура в области повреждения, в частности при ожогах, выше средней температуры тела, и она меняется по мере заживления. При разработке раневого покрытия с термочувствительной матрицей предполагается, что терапевтические агенты будут выделяться в нужной последовательности по мере уменьшения температуры раны (от ~38°C до 32°C) за счет разной температуры коллапса полимерных наногелей.

В данной работе описываются структурные и физико-химические свойства, стабильность, температурные переходы полимерной матрицы на основе поли-N-изопропилакриламида (пНИПАМ) с регулируемой нижней критической температурой растворения (НКТР) от 30 до 40°C за счет сополимеризации НИПАМ с гидрофильными мономерами и сшивающими агентами.

Стабильность полимерного наногеля была исследована методом динамического светорассеивания (DLS). Было показано, что частицы геля имеют однородную структуру с гидродинамическим диаметром порядка 300 нм и узким распределением по размеру. Эта однородность сохранялась при различных значениях pH (в диапазоне pH5–pH8), а также после стерилизации раствора частиц при 126°C. Также методом АСМ было показано, что частицы имеют однородную сферическую структуру с диаметром порядка 300 нм.

Температурные переходы наногеля были изучены с помощью методов ЭПР и DLS при нагревании. При нагревании до 32°C и выше частицы коллапсировали и уменьшались в размерах вплоть до 100 нм. Методом ЭПР с захватом спинового зонда была продемонстрирована способность полимерной матрицы к захвату флуоресцентных меток при нагревании в диапазоне 32–40°C.

Таким образом, был охарактеризован наногель на основе сополимеров пНИПАМ, была показана его стабильность и термочувствительные свойства. Предполагается использовать данную полимерную матрицу для контролируемой загрузки и высвобождения терапевтических молекул. Такой подход является перспективной основой для создания раневых повязок с активными свойствами для лечения ожогов с локальным термочувствительным высвобождением лекарственных препаратов, стимулирующих регенерацию тканей. В дальнейшей работе планируется исследовать раневое покрытие на ожоговых мышинных моделях.

Работа поддержана грантом № 24-45-10012 РФФ-БРФФИ «Микрогелевая система доставки терапевтических средств с управляемым высвобождением для лечения ожоговых поражений кожи».

Сахенберг Е.И. ✉, Красковская Н.А., Шатрова А.Н., Ярцева Н.М., Михайлова Н.А., Хотин М.Г.

Получение и характеристика клеточных линий дермальных фибробластов человека от доноров пожилого возраста

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ lenasakhenberg@yandex.ru

Аннотация. Были получены и охарактеризованы две новые линии дермальных фибробластов человека от пожилых доноров, которые могут быть использованы в исследованиях в области старения и тестирования препаратов, нейро- и геропротекторных препаратов.

Ключевые слова: фибробласты; клеточная линия; клеточные модели; геронтология.

Sakhenberg E.I., Kraskovskaya N.A., Shatrova A.N., Yasrtseva N.M., Mikhailova N.A., Khotin M.G.

Isolation and characterization of cell lines human dermal fibroblasts from elderly donors

Institute of Cytology Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Two new lines of human dermal fibroblasts from elderly donors were obtain and characterized for use in aging research and drug testing for neuro- and geroprotective drugs.

Keywords: fibroblasts; cell lines; *in vitro* models; gerontology.

Исследования в области старения и тестирования нейро- и геропротекторных препаратов требуют разработки адекватных тест-систем и моделей как *in vivo*, так и *in vitro*. В работах в области геронтологии используют модель искусственного состаривания клеток в культуре. Однако у этого подхода есть ограничения, в том числе связанные с потерей эпигенетических меток, накапливаемых с возрастом [1]. Разработка новых моделей, позволяющих обойти эти ограничения, важная и актуальная задача.

Настоящая работа направлена на создание панели клеточных линий, содержащей клетки от доноров разных возрастов: пожилого и молодого. Нами были получены неиммортиализованные линии дермальных фибробластов человека от двух доноров пожилого возраста: женщина 68 лет (клеточная линия DF4) и женщина 80 лет (клеточная линия DF5).

Клетки выделяли методом разрастания первичного эксплантата [2] из кожи, полученной в результате пластических операций. После перевода клеток в культуру они были охарактеризованы по ряду параметров [3]. С использованием набора специфических поверхностных маркеров CD44, CD73, CD90, CD105, HLA-ABC, HLA-DR, CD34 и SSEA-3 методом проточной цитометрии было подтверждено, что полученные клетки относятся к мезенхимным стволовым клеткам. Соответствие кариотипа нормальному проверяли в том числе при длительном культивировании вплоть до 15-го пассажа. Показано, что время удвоения полученных клеточных линий составляет 56–58 часов. Методом окраски на бетта-галактозидазу показано, что линии DF4 и DF5 до 15-го пассажа не подвержены репликативному старению. Получены индивидуальные STR профили полученных клеточных линий. Показано отсутствие контаминаций новых клеточных линий грибами, бактериями и микоплазмами.

Полученные результаты позволили составить паспорта клеточных линий, а клеточные линии DF4 и DF5 будут переданы в ЦКП «Коллекция культур позвоночных» (ИНЦ РАН), являющуюся частью Российской коллекции типовых клеточных культур (РКТКК).

Клеточные линии DF4 и DF5 возможно использовать в исследованиях в области старения и тестирования препаратов, нейро- и геропротекторных препаратов.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант 15.БРК.21.0011 (Соглашение № 075-15-2021-1063).

Список литературы

1. Capano L.S., Sato C., Ficulie E., et al. Recapitulation of endogenous 4R tau expression and formation of insoluble tau in directly reprogrammed human neurons // *Cell Stem Cell*. 2022. Vol. 29, N 6. P. 918–932. doi: 10.1016/j.stem.2022.04.018
2. Freshney R.I. *Culture of animal cells: a manual of basic technique*. New York: Wiley, 2018. doi: 10.1002/9780470649367
3. Крылова Т.А., Мусорина А.С., Зенин В.В., и др. Получение и характеристика неиммortalизованных клеточных линий дермальных фибробластов человека, выделенных из кожи век взрослых доноров разного возраста // *Цитология*. Т. 58, № 11. С. 850–864. EDN: XXRUIN

Светозаров А.С. ✉, Абрамович Р.А., Потанина О.Г., Шарутин И.В., Воробьев А.Н.

Изготовление пеллет кофеина методом экструзии-сферонизации для фенотипирования цитохрома P450

Научно-производственный участок Института регенеративной медицины МНОЦ МГУ, Москва, Россия

✉ andrejsvetozarov@gmail.com

Аннотация. Актуальной является разработка специализированной лекарственной формы для изучения активности цитохрома P450. По результатам исследования разработан состав и технология изготовления пеллет кофеина методом экструзии-сферонизации, для включения их в состав «коктейля» для фенотипирования.

Ключевые слова: фармакотерапия; цитохром P450; фенотипирование; фармацевтическая технология; пеллеты; экструзия-сферонизация.

Svetozarov A.S., Abramovich R.A., Potanina O.G., Sharutin I.V., Vorobyov A.N.

Manufacture of caffeine pellets by extrusion-spheronization for cytochrome P450 phenotyping

Research and production plant of Institute of regenerative medicine MREC MSU, Moscow, Russia

Abstract. The development of a specialized dosage form for studying the activity of cytochrome P450 is relevant. Based on the results of the study, the composition and technology of manufacturing caffeine pellets by extrusion-spheronization were developed to include them in the composition for phenotyping.

Keywords: pharmacotherapy; cytochrome P450; phenotyping; pharmaceutical technology; pellets; extrusion-spheronization.

Изоферменты цитохрома P450 являются основными ферментами, метаболизирующими лекарственные средства в печени, кишечнике и почках. Они ответственны за метаболизм более 60% наиболее распространенных лекарственных средств. Снижение функции цитохрома P450 при поражении или резекции печени может привести к снижению концентрации активных метаболитов в плазме крови или накоплению исходных лекарственных препаратов, что, следовательно, способствует либо снижению эффективности препаратов, либо повышению риска развития побочных эффектов [1]. Соответственно, при восстановлении функций печени, в том числе посредством регенерационной терапии, активность цитохрома P450 является важным маркером эффективности лечения.

Эффективной методикой для исследования функций цитохрома P450 человека является фенотипирование. Фенотипирование — прямое исследование метаболизма лекарственного средства, основанное на фармакокинетике специфического для изофермента маркерного субстрата и соответствующего метаболита. Для фенотипирования активности изоферментов цитохрома P450 в целях сокращения времени исследования можно использовать несколько характерных субстратов метаболизма, вводимых одновременно — так называемый «коктейль». Во многих исследованиях «коктейльного» подхода использовались коммерческие лекарственные формы, которые не были специально разработаны для целей диагностики [2]. Таким образом, можно выявить потребность в удобной и эффективной лекарственной форме для «коктейля» субстратов цитохрома P450.

Целью работы являлась разработка лекарственной формы, подходящей для комбинированных «коктейлей» для фенотипирования. В качестве типичного препарата для коктейля был выбран кофеин, полностью метаболизируемый изоферментом CYP1A2 до параксантина, поскольку он является единственным

фенотипирующим агентом CYP1A2, для которого соответствующие показатели метаболизма полностью валидированы [3]. В качестве лекарственной формы для компонента коктейля были выбраны pellets.

Pellets обладают свойством сыпучести, при этом имеют лучшую текучесть, нежели порошки. Также pellets могут ускорить растворение лекарственных средств и распределение препарата по ЖКТ. Лекарственные средства с низкой биодоступностью и коротким периодом полувыведения эффективно высвобождаются из pellets. Также уже существуют комбинированные препараты, содержащие pellets различных АФС [4, 5].

Для изготовления pellets была выбрана технология экструзии влажной pelletной массы с последующей сферонизацией и сушкой. Целевой диаметр pellets составлял 1 мм. Компонентами для pellets являлись субстанция кофеина и порошок МКЦ. Для приготовления массы для pelletирования в качестве увлажняющей жидкости использовался водный раствор ГПЦ. Планирование исследования осуществлялось в соответствии с методологией полного факторного эксперимента. В качестве факторов эксперимента были приняты:

1. Содержание активного вещества в pelletной массе. Интервал 30–50%.
2. Количество гранулирующей жидкости. Интервал 40–60%.
3. Содержание ГПЦ в гранулирующей жидкости. Интервал 3–7%.

По результатам экспериментов установлено, что наиболее эффективным сочетанием факторов являлось количество АФС 40%, количество гранулирующей жидкости 50%, концентрация раствора ГПЦ 5% — нулевая точка сочетаний факторов. Сопоставимым по эффективности являлся состав АФС — 30%, гранулирующая жидкость — 40%, концентрация ГПЦ — 7%. Pellets данных составов отличались однородностью размеров и округлой формой. Также, исходя из полученных данных, было установлено, что наибольшее влияние на формирование pellets оказал фактор количества гранулирующей жидкости. При избытке гранулирующей жидкости pellets скатывались в чрезмерно крупные агломераты.

Отклонение количества АФС в навесках полученных pellets составило менее 10% для дозировки 10 мг. Тест растворения для pellets двух приведённых составов показал высвобождение более чем 85% кофеина за 15 минут. Средой растворения выступал 0,1М раствор HCl.

Таким образом, был показан потенциал использования pellets в составе лекарственной формы «коктейлей» для фенотипирования. Высокая точность дозирования и скорость высвобождения при использовании pellets могут способствовать повышению точности анализа фенотипирования.

Список литературы

1. Bao Y., Phan M., Zhu J., et al. Alterations of cytochrome p450-mediated drug metabolism during liver repair and regeneration after acetaminophen-induced liver injury in mice // *Drug Metab Dispos.* 2022. Vol. 50, N. 5. P. 694–703. doi: 10.1124/dmd.121.000459
2. Camblin M., Berger B., Haschke M., et al. CombiCap: a novel drug formulation for the Basel phenotyping cocktail // *Int J Pharm.* 2016. Vol. 512, N 1. P. 253–261. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.08.043
3. Fuhr U., Jetter A., Kirchheiner J. Appropriate phenotyping procedures for drug metabolizing enzymes and transporters in humans and their simultaneous use in the «cocktail» approach // *Clin Pharmacol Ther.* 2007. Vol. 81, N 2. P. 270–283. doi: 10.1038/sj.cpt.6100050
4. Shyam K., Rao S., Mishra V. Pelletization technology in pharmaceutical formulation // *IJPRPC.* 2019. Vol. 1, N. 12. P. 1–10.
5. Becker D., Bürger C., Feutren G., et al, inventors. Pharmaceutical multiparticulate composition comprising mycophenolic acid or mycophenolate sodium and combination compositions with rapamycin. European Union patent N EP1670437A1 2006 Jun 21.

Сдобникова С.В. ✉, Махотин С.С., Овсепян А.А.

Возможность формирования артерий *de novo* в заднем отделе глаза при пролиферативной диабетической ретинопатии

МНОУ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ sdobnikova_sv@mail.ru

Аннотация. Наши исследования неососудов (НС) при ПДР показали, что в их жизненном цикле определяющим является наличие коммуникации с ретинальными артериями. Ультраструктурное исследование развитых НС показало, что часть из них имеет строение, типичное для ретинальных артерий. Нами впервые представлено доказательство возможности ангиогенеза при ПДР *de novo*.

Ключевые слова: пролиферативная диабетическая ретинопатия; эпиретинальные мембраны; ангиогенез; ангиогенез.

Sdobnikova S.V., Makhotin S.S., Hovsepyan A.A.

The possibility of forming arteries in the posterior pole of the eye in proliferative diabetic retinopathy *de novo*

Medical Scientific and Educational university of Lomonosov MSU, Moscow, Russia

Abstract. Our studies of neovessels (NS) in PDR have shown that the presence of communication with retinal arteries is crucial in their life cycle. Ultrastructural examination of developed NS has shown that some of them have a structure typical of retinal arteries. For the first time, we have presented evidence of the possibility of arteriogenesis in PDR *de novo*.

Keywords: proliferative diabetic retinopathy; angiogenesis; epiretinal membranes; angiogenesis; arteriogenesis.

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 по задней мембране стекловидного тела; 3) отсутствия сосудов в стекловидном теле в норме; 4) возможности изучения удаленных в ходе операций витрэктомии эпиретинальных мембран с растущими НС. Несмотря на важность изучения ангиогенеза при ПДР, систематизированного исследования НС предпринято не было, что может быть объяснено сложностью получения клинического материала и отсутствием экспериментальной модели. Тем не менее имеется устоявшееся представление о том, что НС при ПДР берут начало от венул и не имеют контакта с артериальным звеном гемодинамики сетчатки [1]. Однако в подобной модели отсутствует градиент давления. Также при выполнении оксиметрии не было выявлено разницы между насыщением кислородом артериол сетчатки и НС [2]. Наше ангиографическое исследование при ПДР показало, что в жизненном цикле НС основную роль играет наличие их перфузии кровью в результате коммуникации с артериальным звеном гемодинамики. Характеристикой, определяющей направление эволюции неососудов при ПДР — прогрессирование, стабилизация или регресс — является наличие или прекращение коммуникации кластеров неососудов (КН) с ретинальными артериями, наиболее часто посредством сформировавшегося интратретинального артериоло-венулярного шунта. При ангиографическом и патоморфологическом исследованиях, на всех стадиях развития, КН демонстрируют воспроизводимую конструкцию. Их архитектура уникальна. На развитых стадиях развития экстраретинальных неоваскулярных сетей нами выявлены все отделы, присущие классической системе региональной гемодинамики. НС при ПДР развиваются таким образом, что ее

«зона роста» постепенно мигрирует от точки врастания. За счет ремоделирования НС в зоне, прилегающей к эпицентру роста, в ней остаются только магистральные НС. Следствием подобного механизма является формирование зональной конструкции сосудистой системы. Экстраретинальные новообразованные сосуды большого калибра имеют диаметр, сравнимый с основными ветвями центральной артерии и вены сетчатки. При ультраструктурном и иммуногистохимическом исследованиях эпиретинальных мембран, в которых были выявлены НС большого калибра, во всех случаях имелись сосуды, демонстрирующие строение типичное для артерий. Важно, что ультраструктура их стенки могла быть идентична строению артерий сетчатки в норме [3], которые отличаются от мышечных артерий такого калибра других органов значительно более развитой средней оболочкой (до 5–7 слоев гладкомышечных клеток) и отсутствием внутренней эластической мембраны. Таким образом, в процессе развития неососудов при ПДР гемодинамический фактор является определяющим, в его основе лежит наличие коммуникации КН с ретинальными артериями. Результатом этой коммуникации является преобразование новообразованных экстраретинальных капилляров в типичные для данного региона артериальные сосуды. В настоящем исследовании впервые представлено патоморфологическое доказательство возможности ангиогенеза при ПДР *de novo*.

Список литературы

1. Patz A. Retinal neovascularisation: early contributions of Professor Michaelson and recent observations // Br J Ophthalmol. 1984. Vol. 68, N 1. P. 42–46. doi: 10.1136/bjo.68.1.42
2. Bek T. Arterial oxygen saturation in neovascularizations in proliferative diabetic retinopathy // Retina. 2018. Vol. 38, N 12. P. 2301–2308. doi: 10.1097/IAE.0000000000001870
3. Hogan M. J., Feeney L. The ultrastructure of the retinal blood vessels. The large vessels // J Ultrastruct Res. 1963. Vol. 39. P. 10–28. doi: 10.1016/s0022-5320(63)80033-7

Сдобникова С.В. ✉, Махотин С.С., Овсепян А.А.

Взаимодействие глиальных клеток и новообразованных сосудов в экстраретинальной ткани при пролиферативной диабетической ретинопатии

Медицинский научно-образовательный университет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ sdobnikova_sv@mail.ru

Аннотация. Исследование не выявило контакта глиальных клеток (ГК) и лидирующих неососудов (НС) при ПДР, но рост НС и пролиферация ГК не были независимыми. Наличие ГК у основания кластеров НС и в «зоне роста» отражает разные варианты процесса: 1) ГК участвуют в инволюции НС; 2) ГК не связаны с ангиогенезом, но оба процесса имеют общие триггеры.

Ключевые слова: пролиферативная диабетическая ретинопатия; ангиогенез; глия; гиалоциты; эпиретинальные мембраны.

Sdobnikova S.V., Makhotin S.S., Hovsepyan A.A.

Interaction of glia and neovessels in extracretinal tissue in proliferative diabetic retinopathy

Medical Scientific and Educational university of Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The study has shown no contact of glial cells (GC) and the leading neovessels (NV) in PDR, but NV growth and GC proliferation are not independent. The presence of GC at the base of HC clusters and in the “growth zone” reflects different process: 1. GC participate in involution of NV; 2. GC not related to angiogenesis, but these processes have common triggers.

Keywords: proliferative diabetic retinopathy; angiogenesis; glia; hyalocytes; epiretinal membranes.

При нормальном эмбриональном ангиогенезе сетчатки показано взаимодействие сосудов и глиальных клеток (ГК) [1]. Существует мнение о том, что пролиферация ГК имеет большое значение при формировании эпиретинальных мембран у человека, в том числе при пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) [2]. Поэтому некоторые авторы классифицируют эпиретинальную ткань при различных заболеваниях сетчатки как «глиоз» или «глиальный рубец». Однако опубликованы единичные наблюдения, посвященные взаимодействию развивающихся неососудов и ГК при ПДР [3, 4, 5]; результаты этих исследований разноречивы. Целью исследования явилось изучение взаимоотношений ГК с «активными» неососудами при ПДР. Целые кластеры неососудов (НС) и окружающая их задняя гиалоидная мембрана были вырезаны «единым блоком» во время витрэктомии у пациентов с ПДР и изучены в виде плоских тотальных препаратов. Образцы были иммуномечены антиглиальным фибриллярным кислым белком (GFAP), а также anti-collagen IV и anti-von Willebrand Factor для идентификации неососудов. GFAP+ ГК были выявлены в 11 из 17 образцов (65%), они коэкспрессировали коллаген IV типа. Фибриллы, иммунопозитивные к коллагену IV типа (GFAP-), были выявлены во всех случаях. ГК имели одинаковый, специфический фенотип и характерное распределение, которые отличали их от GFAP-негативных гиалоцитов: биполярную форму, очень длинные, редко ветвящиеся отростки, а также тенденцию образовывать скопления. В зоне лидирующих капилляров GFAP+ ГК были обнаружены только в 4 случаях, при этом не было выявлено признаков, указывающих на взаимодействие ГК и НС. Во всех случаях ГК преимущественно выявлялись у места ответвления неососудов от материнского сосуда (вокруг эпицентра неоваскуляризации). Наша гипотеза: при ПДР наличие ГК вокруг

эпицентра неоваскуляризации и в зоне лидирующих неососудов отражает разные события. В первом случае GFAP+клетки могут участвовать в процессах, сопряженных с инволюцией новообразованных капилляров при ремоделировании развивающейся неоваскулярной сети или при их регрессе. Во втором случае, когда ГК находились в зоне лидирующих капилляров, пролиферация ГК напрямую не была связана с формированием сосудов; вероятно, у них имеются общие пусковые механизмы. В связи с тем, что фиброзный компонент, в отличие от глиального, был выявлен во всех ЭМ, термины «глиоз» и «глиальный рубец» не в полной мере отражают специфику пролиферативного процесса при ПДР; в равной степени его можно считать фиброзным.

Список литературы

1. Chan-Ling T., Mcleod D., Luty G. Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004. Vol. 45, N 6. P. 2020–2032. doi: 10.1167/iovs.03-1169
2. Bringmann A., Wiedemann P. Involvement of Müller glial cells in epiretinal membrane formation // *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009. Vol. 247, N 7. P. 865–883. doi: 10.1007/s00417-009-1082-x
3. Hosoda Y., Okada M., Matsumura M., et al. Intravitreal neovascular tissue of proliferative diabetic retinopathy: an immunohistochemical study // *Ophthalmic Res.* 1992. Vol. 24, N 5. P. 260–264. doi: 10.1159/000267176
4. Ohira A., De-Juan E.J. Characterization of glial involvement in proliferative diabetic retinopathy // *Ophthalmologica.* 1990. Vol. 201, N 4. P. 187–195. doi: 10.1159/000310150
5. Kim L.A., Wong L.L., Amarnani D.S., et al. Characterization of cells from patient-derived fibrovascular membranes in proliferative diabetic retinopathy // *Mol Vis.* 2015. Vol. 21. P. 673–687.

Селезнева А.В. ✉, Сергеев Н.А., Суздальцева Ю.Г.

Активация сигнальных путей WNT/ β -катенина и BMP инициирует дифференциацию ИПСК человека в латеральные и параксиальные мезодермальные предшественники МСК *in vitro*

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ seleznev01@yandex.ru

Аннотация. Изогенные клеточные модели МСК и их латеральные и параксиальные мезодермальные предшественники были созданы путем последовательной, многоэтапной и специфически направленной дифференцировки человеческих ИПСК для выяснения механизмов, лежащих в основе явления полной регенерации фетальных тканей.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; дифференцировка; латеральная мезодерма; параксиальная мезодерма; BMP; WNT/ β -катенин.

Selezneva A.V., Sergeev N.A., Suzdaltseva Y.G.

Activation of WNT/ β -catenin and BMP signaling pathways triggers the differentiation of human iPSCs into lateral and paraxial mesoderm progenitors of MSCs *in vitro*

Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Isogenic cell models of MSCs and their lateral and paraxial mesoderm progenitors were generated by the sequential, multistage, and specifically targeted differentiation of human iPSCs to elucidate the mechanisms underlying the complete regenerative phenomenon of fetal tissues.

Keywords: induced pluripotent stem cells; multipotent mesenchymal stromal cells; differentiation; paraxial mesoderm; lateral mesoderm; BMP; WNT/ β -catenin.

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК) играют ключевую роль в восстановлении тканей. В отличие от взрослого организма, где заживление ран обычно происходит с различной степенью рубцевания, ткани плода в течение первого и второго триместров беременности способны к регенерации с полным восстановлением исходной морфологии и функциональной активности [1]. Однако механизмы, лежащие в основе этого процесса, остаются слабо изученными из-за этических ограничений, которые затрудняют проведение подобных исследований.

Дифференцировка индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека предоставляет возможность получения генетически идентичных клеточных моделей, соответствующих различным стадиям развития, для проведения исследований, недостижимых *in vivo* [2].

Используя две независимые линии, мы исследовали влияние активации сигнальных путей WNT/ β -катенин и BMP на дифференцировку ИПСК в мезодермальном направлении. Анализ мРНК методом ПЦР в реальном времени показал, что активация сигнального пути WNT в ИПСК приводила к повышению экспрессии маркеров параксиальной мезодермы *DLL1* и *MSGN1* в клетках в течение первых 6 дней дифференцировки. Мезодермальные предшественники, полученные путем активации сигнального пути BMP, обнаруживали

повышенный уровень экспрессии генов, специфичных для латеральной пластинки, включая *HAND1*, *HAND2* и *FOXF1*. Корреляционный анализ установил низкую степень сходства между мезодермальными предшественниками, дифференцированным из ИПСК, экспрессирующими мРНК, специфическую для первичной полоски (*TBXT*, *SNAI1*, *MIXL1*, *BMP4*), латеральной пластинки (*HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*) и параксиальной мезодермы (*DLL1*, *MSGN1*, *WNT5A*). Иерархический анализ экспрессии генов: *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, *TBXT*, *TBX*, *SNAI1*, *CTNNB1*, *KDR*, *HAND1*, *BMP4*, *TGFB1*, *TGFB3*, *FOXF1*, *APLNR*, *PDGFR*, *HAND2*, *WNT5A*, *MEOX1*, *MSGN1*, *MIXL1*, *DLL1*, *HAND1*, *HAND2*, *FOXF1*, *BMP4*, *WNT5A*, *DLL3*, *MSGN1*, *PDGFR*, *KDR* и *APLNR* — выявил низкое родство кластеров, соответствующих параксиальной мезодерме, латеральной пластинке и МСК. Методом проточной цитометрии было также показано, что уровень экспрессии *HAND1* в ядрах клеток, полученных при стимуляции ИПСК BMP, значительно увеличивался, начиная со 2-го дня, и к 21-му дню $94,8 \pm 5,2\%$ клеток были *HAND1*-положительными.

МСК, полученные из ИПСК через стадии параксиальной или латеральной мезодермы с помощью культивирования в среде, содержащей фетальную сыворотку телят, были способны дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, а также экспрессировали типичные поверхностные маркеры *CD73*, *CD90* и *CD105*. Однако анализ поверхностных антигенов, характерных для МСК методом проточной цитометрии показал, что на 6-й день дифференцировки предшественники МСК, полученные из ИПСК, экспонировали на клеточных мембранах только *CD90*. Экспрессия маркеров *CD73* и *CD105* не обнаруживалась на мембранах этих клеток. Следовательно, из-за отсутствия полного спектра минимальных критериев для определения МСК человека, предшественники МСК, дифференцированные из ИПСК, не могут быть классифицированы как зрелые МСК.

Таким образом, путем спецификации ИПСК в мезодермальном направлении с помощью активации сигнальных каскадов WNT/ β -катенин и BMP были получены изогенные клетки параксиальной мезодермы, латеральной пластинки и МСК. Дальнейшее изучение функциональной активности этих клеток в провоспалительном микроокружении может помочь лучше понять основные механизмы регенерации тканей плода, что позволит осуществить принципиально новые подходы к созданию лекарственных препаратов для стимуляции регенеративных процессов в тканях [3].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-24-00026.

Список литературы

1. Colwell A.S., Longaker M.T., Lorenz H.P. Fetal wound healing // *Front Biosci.* 2003. Vol. 8, N 6. P. 1240–1248. doi: 10.2741/1183
2. Suzdaltseva Y., Kiselev S.L. Mesodermal derivatives of pluripotent stem cells route to scarless healing // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 15. doi: 10.3390/ijms241511945
3. Hu M., Maan Z., Wu J., et al. Tissue engineering and regenerative repair in wound healing // *Ann Biomed Eng.* 2014. Vol. 42, N 7. P. 1494–1507. doi: 10.1007/s10439-014-1010-z

Семенова П.И.¹ ✉, Панова А.В.^{2,3}, Сопова Ю.В.¹, Гусев К.О.¹, Краснова О.А.¹, Ковалева А.А.¹, Неганова И.Э.¹

Изменение функциональной активности иМСК при остеогенной дифференцировке после редактирования пациент-специфической линии клеток iPSC с мутацией в гене CaSR

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ psemnova2000@gmail.com

Аннотация. Кальций-чувствительный рецептор (CaSR) — рецептор, связанный с G-белком (GPCR), отвечающий за кальциевый гомеостаз. Исходная линия индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC) имеет сложную гетерозиготную мутацию в 6-м и 7-м экзонах гена CASR, ассоциированную с неонатальным первичным гиперпаратиреозом (NSHPT). Мы создали и охарактеризовали генетически отредактированную линию hiPSC с исправленной последовательностью в 6-м экзоне гена CASR, несущую только мутацию в 7-м экзоне. Генетически модифицированная линия клеток имеет типичную морфологию hiPSCs и сохраняла признаки плюрипотентности после редактирования генома, а также обладает способностью дифференцироваться в индуцированные мезенхимальные стволовые клетки (иМСК). Наши результаты дают прямое доказательство того, что при индукции остеогенной дифференцировки осцилляции Ca²⁺ увеличиваются в генетически модифицированной линии в сравнении с исходной линией, а также повышается экспрессия маркеров ранней остеодифференцировки.

Ключевые слова: кальций-чувствительный рецептор; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; редактирование генома.

Semenova P.I.¹, Panova A.V.^{2,3}, Sopova J.V.¹, Gusev K.O.¹, Krasnova O.A.¹, Kovaleva A.A.¹, Neganova I.E.¹

Change in functional activity of iPSC in osteogenic differentiation after genome editing patient-specific line of iPSC with mutation in CaSR gene

¹ The Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The calcium-sensing receptor (CaSR) is a G-protein-coupled receptor (GPCR) responsible for the control of calcium homeostasis. The original hiPSCs line has a compound heterozygous mutation in the 6th and 7th exons of the CASR gene associated with neonatal severe primary hyperparathyroidism (NSHPT). We generated and characterized a genetically edited hiPSC line with the restored sequence in the sixth exon of the CASR gene, bearing only mutation in the 7th exon. The genetically modified generated cell line had typical hiPSCs morphology and was verified by expression of pluripotency after genome editing and had the ability to differentiate to co-called induced mesenchymal stem cells (iMSC). Our results provide that that induction of osteogenic differentiation increases the number of Ca²⁺ oscillating iMSCs in the edited line was significantly higher compared to the original line. Moreover, the expression of early markers of osteodifferentiation (RUNX2, COL1A1) was also increased.

Keywords: calcium-sensing receptor; induced pluripotent stem cells; genome editing.

Репрограммирование соматических клеток в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) стало одним из главных достижений в исследованиях стволовых клеток. Еще один прорыв в биомедицинских исследованиях был достигнут, когда был впервые использован метод CRISPR/Cas9 для клеток млекопитающих. Сочетание этих технологий создаёт принципиально новые перспективы для персонализированной регенеративной медицины.

Пациент-специфическая линия иПСК была получена ранее от пациента с гипокальциурической гиперкальциемией, ассоциированной со сложной гетерозиготной мутацией [с.1656delA, р.1554SfsX73] + [с.2217T>A, р.С739X] в гене кальций-чувствительного рецептора (*CaSR*), относящегося к семейству рецепторов, связанных с G-белками и взаимодействующего с ионами кальция, обеспечивая реагирование клеток на изменения их внеклеточной концентрации [1].

Генетическое редактирование осуществляли трансфекцией иПСК, с помощью системы Cas9/sgRNA, направленной на последовательность 6-го экзона. Новая отредактированная линия сохранила типичную морфологию hiPSCs, экспрессию маркеров плюрипотентности (OCT4, SOX2, NANOG, DPPA4, DNMT3B) и потенциал к дифференцировке в направлении трех зародышевых листков.

Были использованы методы дифференцирования пациент-специфичных, отредактированных и контрольных иПСК в мезенхимальные стволовые клетки (иМСК). Далее была проведена серия экспериментов, в которых регистрировались кальциевые осцилляции, что позволило оценить функциональное изменение рецептора до и после редактирования. Результаты показали, что при добавлении к клеткам среды с остеофакторами количество осциллирующих иМСК в отредактированной линии значительно больше по сравнению с исходной линией. Более того, иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры ранней остеодифференцировки (RUNX2, COL1A1) показало увеличение экспрессии данных маркеров в отредактированной линии.

Предварительные данные указывают на возможную роль мутации с.1656delA в 6-м экзоне гена *CaSR* в ранней остеодифференцировке, а ее редактирование приводит к улучшению функциональной активности иМСК.

Данная работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

Список литературы

1. Panova A.V., Kulikova K.S., Klementieva N.V., et al. Generation of an induced pluripotent stem cell line HPCASRi002-A from a patient with neonatal severe primary hyperparathyroidism caused by a compound heterozygous mutation in the *CASR* gene // Stem Cell Res. 2021. Vol. 54. doi: 10.1016/j.scr.2021.102414

Семидетнов И.С.¹✉, Алхатиб Р.¹, Романова С.А.¹, Слотвицкий М.М.^{1–3}, Цвелая В.А.^{1–3}, Агладзе К.И.^{1,2}

Оптический контроль динамики межклеточного кальция в индуцированных кардиомиоцитах, полученных из плюрипотентных стволовых клеток, с гипертрофической кардиомиопатией

¹ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

² Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский университет ИТМО, Москва, Россия

✉ ivan.semidetnov@gmail.com

Аннотация. Были выявлены различия в характеристиках кальциевого обмена между здоровыми и больными клеточными линиями, особенно заметные до 30-го дня дифференцировки клеток. Оптическое картирование и компьютерное моделирование позволили детально исследовать эти различия, выявив ключевые параметры, влияющие на динамику кальция. Полученные данные способствуют более глубокому пониманию механизмов нарушения обмена кальция при гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), что имеет потенциал для улучшения диагностики и лечения этой патологии, а также связанных с ней аритмий.

Ключевые слова: iPSC; гипертрофическая кардиомиопатия; аритмии.

Semidetnov I.S.¹, Alkhateeb R.¹, Romanova S.A.¹, Slotvitsky M.M.^{1–3}, Tselaya V.A.^{1–3}, Agladze K.I.^{1,2}

Optical control of intercellular calcium dynamics in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes with hypertrophic cardiomyopathy

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

³ ITMO University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Differences in calcium metabolism characteristics between healthy and diseased cell lines were identified, particularly noticeable before day 30 of cell differentiation. Optical mapping and computer modeling allowed us to study these differences in detail, identifying key parameters affecting calcium dynamics. The obtained data contribute to a deeper understanding of the mechanisms of calcium metabolism disorders in HCM, which has the potential to improve the diagnosis and treatment of this pathology and associated arrhythmias.

Keywords: iPSC; hypertrophic cardiomyopathy; arrhythmias.

Гипертрофическая кардиомиопатия является одним из наиболее распространенных наследственных сердечно-сосудистых заболеваний, поражающих одного из 500 человек во всем мире [2]. Она в основном вызвана мутациями, кодирующими белки, ассоциированные с саркомерами [3]. Наиболее распространенными вариантами лечения ГКМП являются те, которые направлены на облегчение симптомов и снижение риска внезапной сердечной смерти [4]. Однако до сих пор нет эффективного лечения ГКМП, и лучшее понимание патогенности этого заболевания поможет улучшить ранние диагностические и терапевтические методы. Использование модели кардиомиоцитов, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, имеет большое значение, поскольку позволяет нам изучать особенности ГКМП. В этом исследовании две линии iPSC, включая контрольную клеточную линию (m34Sk3) и клеточную линию, полученную от пациента

(НСМ-11f3), были дифференцированы в кардиомиоциты. Оптическое картирование проводилось в разные временные точки процесса дифференциации для измерения изменений кальция и напряжения. Также применялся подход компьютерного моделирования для исследования изменений динамики кальция. Результаты показали различия в характеристиках ГКМП, таких как концентрация кальция до 30-го дня процесса дифференциации в больной клеточной линии. Чтобы использовать экспериментально измеренный потенциал действия в качестве входных данных для моделирования, удаление шума с помощью карты активации, по-видимому, было эффективным для наших данных. Результаты компьютерного моделирования показали основные параметры, которые могут влиять на различия в динамике кальция между здоровыми и больными клеточными линиями. Это исследование поможет разработать более детальное понимание и описание механизмов нарушения обмена кальция при гипертрофической кардиомиопатии. Кроме того, оно позволит лучше понять возникновение аритмии и улучшить методы диагностики и терапии ГКМП и аритмии.

Список литературы

1. Martinez E.C., Ortiz-Garcia N.Y., Hernandez D.A.H., et al. Hypertrophic cardiomyopathy diagnosis and treatment in high-and low-income countries: a narrative review // *Cureus*. 2023. Vol. 15, N 10. doi: 10.7759/cureus.46330
2. Dementyeva E.V., Medvedev S.P., Kovalenko V.R., et al. Applying patient-specific induced pluripotent stem cells to create a model of hypertrophic cardiomyopathy // *Biochemistry (Moscow)*. 2019. Vol. 84, N 3. P. 291–298. doi: 10.1134/S0006297919030118
3. Glavaški M., Velicki L., Vučinić N. Hypertrophic cardiomyopathy: Genetic foundations, outcomes, interconnections, and their modifiers // *Medicina*. 2023. Vol. 59, N 8. P. 1424. doi: 10.3390/medicina59081424
4. Palandri C., Santini L., Argirò A., et al. Pharmacological management of hypertrophic cardiomyopathy: from bench to bedside // *Drugs*. 2022. Vol. 82, N 8. P. 889–912. doi: 10.1007/s40265-022-01728-w

Семкина А.С.^{1,2} ✉, Загоскин Ю.Д.¹, Кузнецов Н.М.¹, Крупнин А.Е.¹, Чвалун С.Н.^{1,2}

Гидрогели на основе тройных блок-сополимеров ПЛА-ПЭГ-ПЛА для тканевой инженерии: реологические свойства и 3D-печать

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Институт синтетических полимерных материалов им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

✉ anya.semkina.97@bk.ru

Аннотация. Изучены реологические свойства растворов тройных блок-сополимеров на основе лактида и полиэтиленгликоля. Гели были получены методом диспергирования сополимеров в воде, изучены реологические и тиксотропные свойства, проведена оценка применимости полученных чернил в качестве материала для 3D-печати.

Ключевые слова: 3D-печать; гидрогели; тройные блок-сополимеры; полилактид; полиэтиленгликоль.

Semkina A.S.^{1,2}, Zagoskin Yu.D.¹, Kuznetsov N.M.¹, Krupnin A.E.¹, Chvalun S.N.^{1,2}

PLA-PEG-PLA triblock copolymer hydrogels for soft tissue engineering: rheological properties and 3D printing

¹ National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials RAS, Moscow, Russia

Abstract. The rheological properties of solutions of triblock copolymers based on lactide and polyethyleneglycol. Gels were obtained by dispersing the copolymers in water, rheological and thixotropic properties were analyzed, the applicability of the obtained inks as a material for 3D printing was assessed.

Keywords: 3D printing; hydrogels; triblock copolymers; polylactide; polyethylene glycol.

Для реализации различных современных прикладных и экспериментальных задач востребованы полимерные гели. Они представляют собой гетерогенную систему, состоящую из пространственной макромолекулярной сетки полимера и молекул растворителя. Особое место в области биомедицинских материалов занимают гидрогели благодаря регулируемым механическим характеристикам, возможности получения стимул-чувствительных, а также биоразлагаемых и биосовместимых составов, что является важнейшими характеристиками для применения в регенеративной медицине [1].

В рамках данной работы получены серии тройных блок-сополимеров полиэтиленгликоля (ПЭГ, 4600 Да) и D,L-лактида со степенью полимеризации лактидного блока ($n_{\text{ПЛА}}$): 10, 18, 23 с использованием различных каталитических систем в растворах: безметалловый катализатор DBU, катализатор октаноат олова ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$). Структура и молекулярно-массовые характеристики были проанализированы методами гель-проникающей хроматографии и ¹H-ЯМР-спектроскопии.

На основе синтезированных ПЛА-ПЭГ-ПЛА были приготовлены гидрогели путем диспергирования тройных блок-сополимеров в воде при комнатной температуре. Концентрацию сополимеров в воде варьировали в диапазоне от 10 до 25 мас. %. На первом этапе работы фазовый золь-гель переход водных растворов тройных блок-сополимеров исследовали методом «переворачивания виалов». На основе данных были построены фазовые диаграммы.

Для подтверждения полученных данных были проведены реологические испытания. Частотные тесты при 25°C показали, что повышение концентрации блок-сополимеров в растворе и увеличение длины гидрофобного блока позволяют получать структуры с более устойчивыми межмолекулярными связями, которые способны при более низких значениях угловой частоты переходить от вязкоупругих свойств к упруго-вязким. С помощью температурных тестов были определены значения температур, при которых происходит гель-золь переход. Вначале испытания модуль накоплений (G') превышает модуль потерь (G''), что свидетельствует о том, что образцы находятся в состоянии геля (при заданных параметрах угловой частоты и амплитуды). При дальнейшем увеличении температуры значения модулей уменьшаются до момента пересечения кривых (G') и (G''). Трехинтервальные (тиксотропные) тесты показали переход от упругого состояния к вязко-текучему под воздействием определенного сдвигового напряжения, что подтверждает тиксотропное поведение материала. Установлено, что после снятия нагрузок материал возвращается в свое гелевое состояние, что указывает на его способность к обратимой деформации. Время, затраченное на восстановление, около 300 секунд, является значительным и может указывать на наличие структурных изменений в образце, которые требуют определенного времени для полного восстановления. Это может быть связано с реорганизацией полимерных цепей или восстановлением межмолекулярных взаимодействий.

Далее для сравнения выбрали образцы растворов сополимеров с $n_{\text{ПЛА}} = 23$, полученных на катализаторах DBU и $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, с концентрациями 20 мас. %. Экспериментальные результаты показывают, что тип катализатора при синтезе сополимеров одного состава (последовательность и длина блоков) влияет на свойства гидрогелей: растворы образцов сополимеров с $n_{\text{ПЛА}} = 23$, синтезированных на DBU, претерпевают переход гель-золь при более высоких температурах. Модули накоплений в этих точках выше, чем для образцов, полученных на октаноате олова.

Проведена оценка применимости полученных материалов в качестве чернил для 3D-печати. Тестовые образцы различной геометрии изготовлены на 3D-биопринтере Allevi 3 со следующими параметрами: скорость печати 3 мм/с; диаметр сопла 20G; высота слоя 0.1 мм; давление 15 psi.

Работа выполнена в рамках соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидии № 075-15-2023-324 от 21 февраля 2023 г.

Список литературы

1. Фомина Ю.С., Семкина А.С., Загоскин Ю.Д., и др. Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфигов и их сополимеров // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85, № 5. С. 682–704. EDN: ZAFXKE doi: 10.31857/S0023291223600554

Сенковенко А.М.^{1,2} ✉, Голубчиков Д.О.^{1,3}, Котенева П.И.¹, Бикмулина П.Ю.¹, Тимашев П.С.^{1–3}

Оценка свойств фотоотверждаемых биочернил с клеточными сфероидными для трехмерной биопечати

¹ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Институт регенеративной медицины, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Центр «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения», Москва, Россия

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Химический факультет, Москва, Россия

✉ senkovenko_a_m@staff.sechenov.ru

Аннотация. В ходе работы были изготовлены фотоотверждаемые биочернила на основе метакрилизованного желатина (GelMA). Эти биочернила применимы для биопечати, а также имеют клеточный компонент — сфероиды из мезенхимных стромальных клеток, необходимый для создания биомиметичной структуры.

Ключевые слова: гидрогель; метакрилованный желатин; метакрилованная гиалуроновая кислота; фотоотверждение; биопечать; клеточные сфероиды; мезенхимные стромальные клетки.

Senkovenko A.M.^{1,2}, Golubchikov D.O.^{1,3}, Koteneva P.I.¹, Bikmulina P.Y.¹, Timashev P.S.^{1–3}

Spheroid-laden photocrosslinkable bionks evaluation for 3D bioprinting

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² World-Class Research Center “Digital Biodesign and Personalized Healthcare”, Sechenov University, Moscow, Russia

³ Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. During the work, photocurable bioinks based on methacrylated gelatin (GelMA) were produced. These bioinks are suitable for bioprinting and also have a cellular component — spheroids from mesenchymal stromal cells, necessary for obtaining a biomimetic structure.

Keywords: hydrogel; methacrylated gelatin (GelMA); methacrylated hyaluronic acid (HAMA); photocrosslinking; bioprinting; cell spheroids; mesenchymal stromal cells.

Метод трехмерной биопечати — один из наиболее перспективных и важных подходов тканевой инженерии для получения биоэквивалентов тканей и органов, необходимых как для трансплантации, так и в качестве модельных объектов для исследований. Таким образом, есть острая необходимость в разработке гидрогелевых биочернил для изготовления разнообразных продуктов, а также оптимизации протоколов биопечати.

Биочернила на основе гиалуроновой кислоты и желатина перспективны для создания разных конструкторов ввиду высокой биосовместимости. Один из наиболее удобных способов сшивки для придания структуре механической жесткости — фотоотверждение. В данной работе основой фотоотверждаемых биочернил являются метакрилованный желатин (GelMA) и метакрилованная гиалуроновая кислота (HAMA), которые в последние годы активно используются для задач тканевой инженерии [1]. Коллагеновая мембрана является перспективной основой для создания печатных биоэквивалентов.

Клеточный компонент необходим для того, чтобы воспроизводить свойства и функции живой ткани. Часто в качестве клеточного компонента используют мезенхимные стромальные клетки (МСК) благодаря их возможности дифференцировки в разные типы клеток в зависимости от условий. Для биопечати широко используются клеточные сфероиды — плотноупакованные 3D-культуры клеток, воспроизводящие *in vivo*

клеточное окружение. Такой способ упаковки позволяет клеткам лучше переносить стресс и активно расселяться внутри гидрогеля, формируя структуру будущей ткани [2]. Однако свойства сфероидов из МСК в контексте биопечати не до конца изучены, существует необходимость доработки и оптимизации протоколов изготовления биоэквивалентов. Для придания конструкции механической жесткости и удобства формирования макроструктуры биоэквивалента совместно с гидрогелем используют дополнительные материалы в роли подложек или матриц. Коллаген встречается в разных типах тканей по всему организму, вследствие чего является популярным материалом для изготовления биоэквивалентов, как в роли биочернил, так и в роли основы для биопечати [3]. Целью данной работы является разработка гидрогелевых биочернил для 3D-биопечати сфероидов из МСК для создания напечатанного биоэквивалента на основе коллагеновой мембраны.

В ходе работы для различных составов фотоотверждаемых биочернил на основе GelMA и HAMA были проведены оценки реологических свойств. Для оптимизации протоколов биопечати были проведены эксперименты по 3D-биопечати различными составами биочернил на ряде подложек, а также на коллагеновую мембрану в качестве основания для биоэквивалентов. Показано, что составы на основе GelMA ввиду высокой текучести имеют невысокое разрешение печатаемых структур и нуждаются в смешивании с более вязкими биоматериалами и тщательной оптимизации протоколов биопечати и моделей печатаемых структур. Биосовместимость подтверждена тестами жизнеспособности как одиночных клеток (МСК человека и человеческие эмбриональные фибробласты линии 977 hTERT), так и моносфероидов из этих клеток. Были проведены наблюдения за жизнедеятельностью клеток и сфероидов в течение 7 суток после печати. Механические свойства сфероидов и напечатанных структур были охарактеризованы с помощью силовой спектроскопии, проведенной посредством зонда для микроиндентации.

Таким образом, в ходе работы были разработаны и протестированы стерильные биосовместимые фотоотверждаемые биочернила. Для клеток и клеточных сфероидов была оценена их жизнеспособность внутри гидрогеля до биопечати и в застывшем гидрогеле после фотоотверждения, показано, что состав биочернил биосовместим как в контакте с клетками, так и при воздействии на них его экстрактом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках гранта, соглашение № 075-15-2024-640 (Сеченовский Университет).

Список литературы

1. Wang G., An Y., Zhang X., et al. Chondrocyte spheroids laden in GelMA/HAMA hybrid hydrogel for tissue-engineered cartilage with enhanced proliferation, better phenotype maintenance, and natural morphological structure // *Gels*. 2021. Vol. 7, N 4. P. 247. doi: 10.3390/GELS7040247
2. Bauer M., Kang L., Qiu Y., et al. Adult cardiac progenitor cell aggregates exhibit survival benefit both *in vitro* and *in vivo* // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, N 11. doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0050491
3. Min Lee J., Kang Qiang Suen S., Long Ng W., et al. Bioprinting of collagen: considerations, potentials, and applications // *Macromol Biosci*. 2021. Vol. 21, N 1. doi: 10.1002/MABI.202000280

Сербина О.О. ✉, Киселева Е.В.

Активация эндотелиальных клеток миобластами с фенотипом ЛЛПМД как один из клеточных механизмов развития патологии

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

✉ olatyeva94@gmail.com

Аннотация. Взаимодействие и дисбаланс различных типов клеток в очаге воспаления при ЛЛПМД приводит к выработке многочисленных факторов, которые вместе могут нарушать микроокружение поврежденной ткани, а также способствовать ремоделированию ВКМ и ангиогенезу в поврежденной мышечной ткани.

Ключевые слова: миобласты; МСК; ЛЛПМД; фиброз; внеклеточный матрикс; HUVEC.

Serbina O.O., Kiseleva E.V.

Activation of endothelial cells by myoblasts with the FSHD phenotype as one of the cellular mechanisms of pathology development

Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. The interaction and disbalance of different cell types at the site of inflammation in FSHD leads to the production of numerous factors that together can disrupt the microenvironment of damaged tissue, as well as promote ECM remodeling and angiogenesis in damaged muscle tissue.

Keywords: myoblasts; MSC; FSHD; fibrosis; extracellular matrix; HUVEC.

В процессе развития лице-лопаточно-плечевой мышечной дистрофии (ЛЛПМД) мышечная ткань дегенерирует с последующим фиброзом. Патофизиологический фиброз — процесс чрезмерного накопления компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и нарушение нормальной регенерации ткани. Пораженные мышцы инфильтрированы лимфоцитами, что свидетельствует о воспалении. Взаимодействие различных типов клеток в очаге воспаления приводит к выработке многочисленных факторов роста, протеолитических ферментов, ангиогенных факторов, белков ВКМ и цитокинов, которые вместе изменяют микроокружение поврежденной ткани и стимулируют формирование соединительной ткани, постепенно разрушая и заменяя архитектуру мышечной ткани. Ранее мы показали, что миобласты от доноров с ЛЛПМД могут стимулировать миграцию и пролиферацию МСК. Под действием миобластов от больных доноров МСК образуют фиброзные узелки *in vitro* и увеличивают синтез коллагена и фибронектина — основных белков ВКМ, тем самым способствуя фиброзу мышечной ткани. Действие МСК в свою очередь увеличивает уровень экспрессии ЛЛПМД-миобластами факторов ремоделирования внеклеточного матрикса (MMP2, TIMP3). В биопсиях от пациентов с ЛЛПМД было отмечено изменение сосудистой сети в пораженной мышечной ткани. Мы ранее показали, что миобласты от больных доноров имеют увеличенный уровень синтеза и секреции VEGF, а также увеличенную экспрессию мРНК ангиопоэтина. В данном исследовании мы оценили влияние миобластов на эндотелиальные клетки. В качестве модельного объекта были взяты первичные эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC). С помощью ИФА и проточной цитометрии показано, что миобласты увеличивают уровень синтеза VEGF, однако значимой разницы между клетками от больных и здоровых доноров не выявлено. Также не было выявлено влияния миобластов на уровень коллагена IV типа и фибронектина в эндотелиальных клетках. Однако обнаружено нарушение целостности

эндотелиального слоя и уменьшение содержания фактора фон Виллебранда (vWF) в эндотелиальных клетках при действии кондиционированных миообластами сред, влияние миобластов с фенотипом ЛЛПМД было более выражено. Таким образом, изменение целостности эндотелиального слоя и секреция vWF при действии секреторируемых миообластами факторов может являться одним из механизмов развития отека пораженных мышц и инвазии их клетками воспаления.

Сергеева Т.О. ✉

Исследование регенеративных процессов в сердечной ткани

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

✉ sergeeva2969@yandex.ru

Аннотация. В настоящей работе было изучено взаимодействие хозяин — трансплантат при трансплантации кардиомиоцитов на монослой с использованием нановолоконных микроносителей. Были использованы полимерные нановолокна для формирования архитектуры ткани, волны возбуждения регистрировали с помощью установки оптического картирования возбуждения, трехмерные структуры пятна контакта подсаженной сокультуры и монослоя кардиомиоцитов исследованы с помощью конфокальной микроскопии.

Ключевые слова: тканевая инженерия сердца; аритмии; кардиомиоциты; регенерация; микроносители.

Sergeeva T.O.

Investigation of regenerative processes in cardiac tissue

MIPT, Moscow, Russia

Abstract. In this work, the host–graft interaction was studied during transplantation of cardiomyocytes onto a monolayer using nanofiber microcarriers. Polymer nanofibers were used to form the tissue architecture, excitation waves were recorded using an optical excitation mapping device, three-dimensional structures of the contact spot of the planted culture and the monolayer of cardiomyocytes were studied using confocal microscopy.

Keywords: cardiac tissue engineering; arrhythmias; cardiomyocytes; regeneration; microcarriers.

Особенностью строения сердечной ткани является ярко выраженная структурная и функциональная анизотропия, необходимая для поддержания нормальной работы сердца [1]. Наиболее распространенной моделью исследования возбудимости сердечной ткани является монослой из кардиомиоцитов, помещаемый на тканево-инженерную субстратную подложку, структурированную таким образом, чтобы придать клеточной культуре требуемую архитектуру. В качестве клеточного материала используют клетки, выделяемые из неонатальных сердец крыс [2], или клетки иммортализованной клеточной линии [3].

В настоящей работе было изучено взаимодействие хозяин — трансплантат при трансплантации кардиомиоцитов на монослой с использованием нановолоконных микроносителей. Были использованы полимерные нановолокна для формирования архитектуры ткани, волны возбуждения регистрировали с помощью установки оптического картирования возбуждения, трехмерные структуры пятна контакта подсаженной сокультуры и монослоя кардиомиоцитов исследованы с помощью конфокальной микроскопии.

Первым и основным компонентом является фрагмент полимерного волокна толщиной приблизительно $0,85 \text{ мкм} \pm 0,18 \text{ мкм}$ ($n = 20$), полученный путем электроформования раствора PLLA. Вторым элементом является белковое покрытие полимерного волокна путем помещения волокон в раствор HFN на 24 часа. Это привело к отложению белка на поверхности волокна, что проявилось в способности кардиомиоцитов прилипать к волокнам заданной толщины.

Убедительным доказательством клеточной адгезии является восстановление спонтанной возбудимости клеток, паттерны сигналов спонтанного возбуждения. Средний сигнал (mean) был получен на основе 16 следов кальция, полученных из 16 различных клеток (4 разных образца) с частотами спонтанного возбуждения в диапазоне от 0,5 до 1,5 Гц. Важным условием было отсутствие связи между клетками.

Список литературы

1. Biegus J., Niewinski P., Josiak K., et al. Pathophysiology of advanced heart failure: what knowledge is needed for clinical management? // Heart Fail Clin. 2021. Vol. 17, N 4. P. 519–531. doi: 10.1016/j.hfc.2021.06.001
2. Chlopcíková S., Psotová J., Miketová P. Neonatal rat cardiomyocytes--a model for the study of morphological, biochemical and electrophysiological characteristics of the heart // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2001. Vol. 145, N 2. P. 49–55.
3. Claycomb W.C., Lanson N.A. Jr., Stallworth B.S., et al. HL-1 cells: a cardiac muscle cell line that contracts and retains phenotypic characteristics of the adult cardiomyocyte // Proc Natl Acad Sci USA. 1998;95(6):2979–2984. doi: 10.1073/pnas.95.6.2979

Сергеев Н.А. ✉, Селезнева А.В., Суздальцева Ю.Г.

Функциональная активность клеток ранней мезодермы, дифференцированных из ИПСК человека, в ответ на стимуляцию IFN- γ и TNF- α

Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, Россия

✉ sergeevn1998@gmail.com

Аннотация. Синхронное сравнение функционального состояния и скорости миграции изогенных клеток ранней мезодермы и МСК, дифференцированных из ИПСК, в про-воспалительном микроокружении было проведено для определения молекулярных механизмов, лежащих в основе феномена полноценной регенерации фетальных тканей.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; воспаление; BMP; WNT/ β -катенин; IFN- γ ; TNF- α .

Sergeev N.A., Selezneva A.V., Suzdaltseva Y.G.

Functional activity of early mesoderm cells differentiated from human iPSCs in response to IFN- γ and TNF- α stimulation

Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. A synchronous comparison of the functional state and migration rate of isogenic cells of the early mesoderm and MSCs differentiated from iPSCs in a proinflammatory microenvironment was performed to determine the molecular mechanisms underlying the phenomenon of complete regeneration of fetal tissues.

Keywords: induced pluripotent stem cells; multipotent mesenchymal stromal cells; inflammation; BMP; WNT/ β -catenin; IFN- γ ; TNF- α .

Возможность генерировать клетки, соответствующие различным стадиям эмбрионального развития *in vitro*, путем дифференциации индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) позволяет изучить их функциональную активность в про-воспалительном микроокружении для понимания механизмов, лежащих в основе феномена регенерации эмбриона человека до третьего триместра беременности с полным восстановлением первоначальной структуры поврежденных тканей. Клетки стромального дифферона играют важную роль в регуляции процессов регенерации. Для получения клеток ранней мезодермы использовали две клеточные линии ИПСК человека, которые в результате активации сигнальных путей WNT/ β -катенин или BMP4 были дифференцированы в клетки параксиальной и латеральной мезодермы соответственно, из которых путем культивирования в среде, содержащей фетальную сыворотку телят, затем были получены изогенные мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (МСК). Воспалительный статус и скорость миграции изогенных мезодермальных клеток, полученных из ИПСК, оценивали после стимуляции интерфероном- γ (IFN- γ) или фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) с помощью анализа экспрессии генов методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ и скретч-теста. Предшественники МСК демонстрировали повышенный уровень экспрессии транскрипционного фактора GLI1 по сравнению с изогенными МСК. WNT-индуцированные предшественники МСК демонстрировали значительное усиление экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2) и Engrailed Homeobox 1 (EN1). В то же время более высокие уровни экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) наблюдались в предшественниках МСК, дифференцированных из ИПСК под воздействием BMP4. Более того, стимуляция WNT приводила к увеличению скорости миграции

и определяла упорядоченную ориентацию мезодермальных предшественников по сравнению с их аналогами, стимулированными BMP4, и изогенными МСК в скретч-тесте. Однако экспрессия IDO и молекулы межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) была значительно снижена в предшественниках МСК по сравнению с изогенными МСК в ответ на стимуляцию IFN- γ и TNF- α . Предшественники МСК, полученные из ИПСК, активированных через сигнальные пути WNT/ β -катенин или BMP4, обладали повышенной скоростью миграции при воздействии IFN- γ и меньшей миграционной активностью в присутствии TNF- α по сравнению с изогенными МСК.

Изогенные модели мезодермальных клеток, соответствующих различным стадиям развития человека, могут быть полезны для выяснения биологических характеристик и функционального состояния их аналогов *in vivo*, а также определения ключевых молекул и мишеней, определяющих способность тканей к полноценной регенерации. В перспективе новые данные, полученные в данной работе, позволят получить инновационные субстанции лекарственных средств на основе биологически активных молекул, способных радикально изменить специфические генетически контролируемые ответы клеток на поступающие сигналы и осуществить селективные фенотипические эффекты в организме для стимуляции регенеративных процессов в тканях при многих заболеваниях.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 23-24-00026.

Сережникова Н.Б. ✉, Файзуллин А.Л., Тимакова А.А., Иванова Е.И., Ершов Б.П., Файзуллина Н.М., Уласов И.В., Малоголовкин А.С., Котова С.Л., Тимашев П.С.

Перспективы периимплантационного таргетирования с использованием модифицированных аденовирусных векторов в регенеративной медицине

Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ serezhnikova_n_b@staff.sechenov.ru

Аннотация. С использованием молекулярно-биологических и гистологических методов проведено сравнительное морфологическое исследование влияния наличия имплантата и модификаций аденовируса на специфичность и эффективность локальной доставки генов в клеточные компоненты периимплантационной ниши *in vivo*.

Ключевые слова: периимплантационная ниша; имплантируемые биоматериалы; репаративная регенерация; биораспределение; аденовирус; локальная доставка генов; генная терапия; ПЦР *in situ*.

Serezhnikova N.B., Fayzullin A.L., Timakova A.A., Ivanova E.I., Ershov B.P., Fayzullina N.M., Ulasov I.V., Malogolovkin A.S., Kotova S.L., Timashev P.S.

Prospects of peri-implant targeting using modified adenoviral vectors in regenerative medicine

Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. Using molecular biological and histological method, a comparative morphological study was conducted on the effect of the presence of an implant and adenovirus modifications on the specificity and efficiency of local gene delivery to the cellular components of the peri-implantation niche *in vivo*.

Keywords: peri-implant niche; implantable biomaterials; reparative regeneration; biodistribution; adenovirus; local gene delivery; gene therapy; PCR *in situ*.

Одной из передовых медицинских технологий для стимуляции процессов репарации и регенерации или коррекции различных аномальных процессов является генная терапия [1]. Однако данная технология имеет ряд ограничений с точки зрения специфичности воздействия. Для решения этой проблемы мы предлагаем новый подход — периимплантационное таргетирование, основанное на избирательной доставке вектора (например, аденовируса) в клеточные компоненты соединительнотканной капсулы, окружающей имплантат (периимплантационная ниша). Учитывая то, что рецепторы аденовирусов присутствуют на клетках в зонах репаративного воспаления [2], можно искусственно создавать подобные области путем введения небольших имплантатов. Использование имплантатов открывает перспективу для адресной доставки генетического материала в определенные клетки и ткани [3] и их эффективной и безопасной трансдукции в пределах заданной анатомической структуры, без утечки искусственно вносимых генов в другие участки тела, что будет универсально применимо для любых клеток, тканей и органов человека. В нашей работе была исследована эффективность и специфичность трансдукции клеток периимплантационной ниши у мышей с имплантированными подкожно коллагеновыми мембранами на 3-и и 7-е сутки после инъекции модифицированных аденовирусных векторов Ad5/3 и ADwt. Биораспределение аденовирусных векторов и уровень трансдукции клеток-мишеней оценивались методом ПЦР *in situ* (аплификатор Eppendorf, Германия) на препаратах периимплантационных тканей, визуализированных на конфокальном микроскопе

Olympus FV3000 (Olympus, Япония). Гистологические препараты этих же участков, окрашенные гематоксилином и эозином и пикросириусом красным, изучались в микроскопе Leica DM 4000 B LED (Leica, Германия). Морфометрический анализ полученных результатов проводился в программе ImageJv1.54j, а статистический анализ осуществлялся в программе GraphPadPrism 10.00. На основании сравнительного морфологического исследования был определен оптимальный протокол локальной доставки генов с помощью аденовирусных векторов для задач периимплантационного таргетирования. Было охарактеризовано влияние модификации аденовируса на тропность и эффективность доставки гена в клеточные компоненты периимплантационной ниши и установлено, что Ad 5/3 по этим параметрам значительно превосходит AD wt. При этом было показано, что в отсутствии коллагенового имплантата эффективность трансдукции клеток-мишеней обоими аденовирусными векторами снижалась. Морфометрический анализ локализации трансдуцированных клеток выявил преимущественно фибробласты соединительнотканной капсулы, окружающей имплантат. Развитие и дальнейшее применение предлагаемого нами метода периимплантационного таргетирования способно обеспечить локальную, эффективную и безопасную доставку генов, что позволит значительно расширить показания к генной терапии и её доступность для врачей и пациентов. Кроме того, данный метод может быть адаптирован для использования в различных органах, при различных заболеваниях, а также совместим с различными типами вирусных векторов. Наиболее значимые и быстрые результаты применения данной технологии в перспективе возможны в стоматологии (быстрое и более эффективное приживление зубных имплантов), реконструктивной хирургии (реконструкция молочных желез после мастэктомии без необходимости ревизии имплантатов), хирургической ортопедии (протезы суставов), лечении органа-специфических фиброзов, кардиохирургии (стенды), а также и во многих других областях регенеративной медицины.

Исследование было выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00467).

Список литературы

1. Li X., Le Y., Zhang Z., et al. Viral vector-based gene therapy // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24. doi: 10.3390/ijms24097736
2. Ortiz-Zapater E., Santis G., Parsons M. CAR: a key regulator of adhesion and inflammation // *Int J Biochem Cell Biol*. 2017. Vol. 89. P. 1–5. doi: 10.1016/j.biocel.2017.05.025
3. Wang W., Yu Y., Jiang Y., et al. Silk fibroin scaffolds loaded with angiogenic genes in adenovirus vectors for tissue regeneration // *J Tissue Eng Regen Med*. 2019. Vol. 13, N 5. P. 715–728. doi: 10.1002/term.2819

Сигарева Л.П.¹✉, Михайлова Е.В.^{1,2}, Кромский С.В.¹, Александров В.Н.^{1,3}, Насыров Р.А.¹

Экспериментальная терапия аутоиммунного гломерулонефрита с применением внеклеточных везикул от культивирования мезенхимных мультипотентных стромальных клеток

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, Россия

✉ sigaryowa@yandex.ru

Аннотация. Крысам с аутоиммунным гломерулонефритом проводили двукратную инъекцию внеклеточных везикул (ВВ) с интервалом 7 сут. ВВ выделяли из среды с культивируемой мононуклеарной фракцией костного мозга здоровой крысы. Введение ВВ приводило к коррекции протеинурии, сопоставимой с действием клеточной терапии.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; аутоиммунный гломерулонефрит; активный нефрит Хейманна.

Sigareva L.P.¹, Mikhailova E.V.^{1,2}, Kromsky S.V.¹, Aleksandrov V.N.^{1,3}, Nasyrov R.A.¹

Experimental therapy of autoimmune glomerulonephritis using extracellular vesicles from cultured mesenchymal multipotent stromal cells

¹ Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint Petersburg State Pediatric Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

² Federal State budgetary institution of science "Institute of Cytology" Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Saint Petersburg, Russia

³ Federal State budgetary military Educational Institution of Higher Education "Military Medical Academy named after S.M. Kirov" of the Ministry of Defense of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Rats with autoimmune glomerulonephritis were given double injections of extracellular vesicles (EV) with a 7-day interval. EV were isolated from the medium with cultured mononuclear fraction of bone marrow of healthy rats. The introduction of EV led to correction of proteinuria comparable to the effect of cell therapy.

Keywords: extracellular vesicles; mesenchymal multipotent stromal cells; autoimmune glomerulonephritis; active Heymann nephritis.

Аутоиммунные гломерулонефриты (АГ) — совокупность провоспалительных прогрессирующих заболеваний почек, опосредованных взаимодействием почечных структур с компонентами иммунной системы. Среди заболеваний почек АГ не являются самыми распространёнными, но тяжесть последствий, низкая выявляемость в начале и невысокая эффективность стандартной терапии делают группу этих заболеваний наиболее интересной для исследований и подбора современных лекарств и методик лечения [1]. Доклинические исследования с применением биомедицинских клеточных продуктов на основе мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) различных источников показывают их высокую эффективность в терапии провоспалительных аутоиммунных заболеваний, но использование живых клеток сопряжено

с рисками иммуно-, опухолю- и онкогенности [1, 2], что делает более перспективной разработку препаратов с продуктами их метаболизма, внеклеточными везикулами (ВВ). ВВ — группа везикул, покрытых билипидным слоем и содержащих активные биомолекулы: белки и нуклеиновые кислоты, необходимые для осуществления межклеточной коммуникации во внеклеточной среде. ММСК способны выделять ВВ, посредством которых оказывают влияние на клеточное микроокружение, в том числе запуская репарацию и дифференцировку, подавляя местный иммунитет и развитие фиброза [3].

В настоящей работе моделировали активный нефрит Хейманна на самках крыс породы Вистар ($m = 277$ г; $n = 10$) [4], оценивали изменения биохимических параметров суточной мочи: концентрацию общего белка (BioSystems S.A., Испания), креатинина и мочи (Эко-Сервис, РФ). После появления симптомов заболевания двукратно проводили инъекцию ВВ в хвостовую вену (общий объем 200 мкл, шприц инсулиновый, игла 26G, Vogt Medical, Германия), с интервалом 7 сут. ВВ методом ультрацентрифугирования получали из культуральной среды (DMEM, гл. 1 г/л, без фенола красного) после 3 сут культивирования ММСК (количество клеток 6×10^7), полученных из костного мозга здоровой неродственной крысы породы Вистар 2-месячного возраста (3–4 пассаж). Данные экспериментов представлены в виде медианы и квартилей (Me [Q_1 ; Q_3]), для сравнения групп использовали ANOVA с последующей процедурой Тьюки, различия считали достоверными при $p < 0.05$.

АГ в нашей модели у крыс проявлялся протеинурией (общий белок 0.94 [0.91; 1.05] г/л), снижением концентрации креатинина (4.84 [4.12; 5.56] ммоль/л) и мочевины (520.29 [467.41; 544.09] ммоль/л) по сравнению со здоровыми животными (общий белок 0.21 [0.19; 0.21] г/л, креатинин — 6.24 [5.05; 7.15] ммоль/л, мочевина — 1209.98 [1158.72; 1217.46] ммоль/л). На 7-е сут после первой инъекции ВВ наблюдали снижение общего белка до 0.42 [0.41; 0.44] г/л (на 44.7%), при этом концентрации креатинина (4.59 [4.26; 4.93] ммоль/л) и мочевины (414.19 [412.03; 415.34] ммоль/л) оставались сильно пониженными по сравнению со здоровыми животными. После второй инъекции ВВ через 7 сут концентрация белка продолжила снижение до 0.25 [0.23; 0.28] г/л, вернувшись к показателям здоровых животных, но значения креатинина (4.72 [4.23; 5.16] ммоль/л) и мочевины (590.04 [575.69; 607.39] ммоль/л) оставались на уровне заболевания.

Таким образом, терапия с применением ВВ схожа по эффективности с терапией культивируемыми ММСК, и опосредована паракринными противовоспалительными и иммуномодулирующими факторами. Один из показателей, достоверно указывающий на развитие патологического процесса — протеинурия — снижался до показателя здоровых животных в течение 14 сут после первой инъекции ВВ.

Список литературы

1. Anders H.J., Kitching A.R., Leung N., et al. Glomerulonephritis: immunopathogenesis and immunotherapy // Nat Rev Immunol. 2023. Vol. 23, N 7. P. 453–471. doi: 10.1038/s41577-022-00816-y
2. Yamanaka S. Pluripotent stem cell-based cell therapy—promise and challenges // Cell Stem Cell. 2020. Vol. 27, N 4. P. 523–531. doi: 10.1016/j.stem.2020.09.014
3. Quaglia M., Merlotti G., Fornara L., et al. Extracellular vesicles released from stem cells as a new therapeutic strategy for primary and secondary glomerulonephritis // Int J Mol Sci. 2022. Vol. 23, N 10. P. 5760. doi: 10.3390/ijms23105760
4. Wang Y.M., Lee V.W.S., Wu H., et al. Heymann nephritis in Lewis rats // Curr Protoc Immunol. 2015. Vol. 109. P. 15.29.1–15.29.6. doi: 10.1002/0471142735.im1529s109

Силачев Д.Н.^{1,2} ✉, Горюнов К.В.¹

Нейропротекторные факторы внеклеточных везикул мезенхимальных стромальных клеток: от молекул к механизмам действия

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ silachevdn@genebee.msu.ru

Аннотация. В наших исследованиях мы подтвердили важную роль внеклеточных везикул, секретируемых мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, в восстановлении повреждённой периферической и центральной нервной системы, поддержании нейропластичности, и выявили ряд механизмов и молекул, участвующих в этих процессах.

Ключевые слова: инсульт; неонатальная гипоксическая ишемическая энцефалопатия; травма головного мозга; нейропротекция; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; внеклеточные везикулы.

Silachev D.N.^{1,2}, Goryunov K.V.¹

Neuroprotective factors of extracellular vesicles of mesenchymal stromal cells: from molecules to mechanisms of action

¹ Federal state budgetary institution “V.I. Kulakov National medical research center of obstetrics, gynecology and perinatology” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² A.N. Belozersky Scientific Research Institute of Physico-Chemical Biology of M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. In our research, we have confirmed the important role of extracellular vesicles secreted by multipotent mesenchymal stromal cells in repairing damaged peripheral and central nervous systems, maintaining neuroplasticity, and identified a number of mechanisms and molecules involved in these processes.

Keywords: stroke; neonatal hypoxic ischemic encephalopathy; brain injury; neuroprotection; multipotent mesenchymal stromal cells; extracellular vesicles.

Острые повреждения головного мозга, такие как инсульт, неонатальная гипоксически-ишемическая энцефалопатия (ГИЭ) и черепно-мозговая травма (ЧМТ), являются основными причинами инвалидизации и смертельных исходов [1]. Новые терапевтические стратегии нейропротекции сосредоточены на улучшении выживаемости клеток (нейронов и глии) и повышении их нейропластичности в условиях развивающихся патологических процессов. Одним из таких инновационных подходов является использование клеточных технологий — трансплантация клеток, особенно мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (МСК) или их биологических продуктов. МСК продемонстрировали эффективность своего регенеративного потенциала на различных *in vitro* и *in vivo* моделях повреждений головного мозга. Однако для успешного применения в клинике необходимо чёткое понимание молекулярных механизмов, посредством которых реализуется нейропротекция. На данный момент известно, что МСК обладают иммунорегулирующей, ангиогенной и антиапоптозной активностью [2]. Большинство исследователей сходятся во мнении, что МСК реализуют свои цитопротекторные эффекты паракринным способом, включая использование внеклеточных

везикул (ВВ). ВВ привлекают внимание в контексте нейропротекции благодаря способности преодолевать гематоэнцефалический барьер и осуществлять адресную доставку биологически активных компонентов, продуцируемых МСК. Многочисленные исследования подтверждают наличие нейропротекторных факторов во внеклеточных везикулах, секретируемых МСК (МСК-ВВ). Тем не менее молекулярные механизмы, лежащие в основе этих нейропротекторных эффектов, остаются малоизученными. Содержимое ВВ включает ключевые классы биологически активных молекул, такие как белки, нуклеиновые кислоты и липиды. Следовательно, идентификация нейропротекторных молекул в этих классах и выяснение молекулярных путей, на которые они влияют, является важной задачей как для фундаментальных исследований, так и для клинического применения.

В наших недавних исследованиях мы продемонстрировали способность МСК-ВВ проявлять значительные нейропротекторные свойства благодаря различным молекулярным механизмам [3, 4]. МСК-ВВ оказывают антиапоптотическое действие, которое ингибирует гибель нейронов в моделях неонатальной ГИЗ *in vivo* и гипераммониемии *in vitro*. Кроме того, наши эксперименты *in vitro* показали, что добавление МСК-ВВ к первичным культурам нейронов гиппокампа значительно улучшает рост нейритов по сравнению с контрольной группой, что свидетельствует о влиянии ВВ на нейропластичность. Известно, что процессы клеточной гибели, пролиферации и роста нейритов в нейронах регулируются среди прочих механизмов Ca^{2+} сигнализацией. В ишемической модели *in vitro* МСК-ВВ предотвращали перегрузку клеток кальцием и последующую гибель клеток. В смешанной нейроглиальной культуре МСК-ВВ вызывали кальциевые осцилляции, реализуемые через рецепторы инозитолтрифосфата (IP3) в астроцитах, с данным феноменом была выявлена связь с устойчивостью к кальциевой перегрузке не только в астроцитах, но и в культуре нейронов, демонстрируя положительное межклеточное взаимодействие между нервными клетками. Протеомный анализ МСК-ВВ выявил многочисленные белковые кластеры, связанные с важнейшими биологическими процессами, необходимыми для нормального функционирования клеток. Среди них: пролиферация и выживание, клеточная адгезия, организация внеклеточного матрикса, структурные компоненты рибосом, клеточная подвижность. Особое внимание было уделено сигнальному пути фосфоинозитид-3-киназы/протеинкиназы В (PI3K/Akt) в связи с его фундаментальной ролью в выживании клеток. Ключевые компоненты, обнаруженные в рамках этого пути, включали рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецепторы тромбоцитарного фактора роста (PDGFR- α и PDGFR- β), тромбоцитарный фактор роста D (PDGF-DD), интегрины А и В (ITGA и ITGB) и G-белки. В дальнейшем мы показали, что инкубация первичной культуры нейронов и астроцитов в условиях глюкозно-кислородной депривации в присутствии ингибиторов PI3K-Akt сигнального пути отменяла защитное действие ВВ в астроцитах, так и в нейронах. Это предполагает, что сигнальный путь PI3K/Akt является одним из основных путей в МСК-ВВ-опосредованной защите нервных клеток, подвергшихся ишемическому воздействию [3].

Мы продемонстрировали нейропротекторную роль МСК-ВВ в периферической нервной системе. На крысиной модели повреждения седалищного нерва трансплантация ВВ способствовала восстановлению маркера нейрофиламентов — NF-200, указывающего на созревание и стабилизацию аксонов, а также связанного с ростом белка 43 типа (GAP-43), маркера регенерации аксонов. Кроме того, в поврежденной конечности наблюдалось 40% функциональное улучшение двигательной активности по сравнению с контрольной группой без терапии [4].

Таким образом, мы представили доказательства комплексного нейропротекторного действия МСК-ВВ, подчеркнув их потенциальное применение в лечении нейрональных патологий. Это особенно актуально в неонатологии, где незрелость нервной системы новорожденных значительно способствует развитию критических состояний, терапия которых требует использования инновационных подходов [5].

Список литературы

1. Lopez A.D., Mathers C.D., Ezzati M., et al. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data // *Lancet*. 2006. Vol. 367, N 9524. P. 1747–1757. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68770-9
2. Rubtsov Y., Goryunov K., Romanov A., et al. Molecular mechanisms of immunomodulation properties of mesenchymal stromal cells: a new insight into the role of ICAM-1 // *Stem Cells Int*. 2017. Vol. 2017. doi: 10.1155/2017/6516854.

3. Turovsky E.A., Golovicheva V.V., Varlamova E.G., et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles afford neuroprotection by modulating PI3K/AKT pathway and calcium oscillations // *Int J Biol Sci.* 2022. Vol. 18, N 14. P. 5345–5368. doi: 10.7150/ijbs.73747
4. Demyanenko S.V., Pitinova M.A., Kalyuzhnaya Y.N., et al. Human multipotent mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles enhance neuroregeneration in a rat model of sciatic nerve crush injury // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 15. P. 8583. doi: 10.3390/ijms23158583
5. Goryunov K., Ivanov M., Kulikov A., et al. A review of the use of extracellular vesicles in the treatment of neonatal diseases: current state and problems with translation to the clinic // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, N 5. P. 2879. doi: 10.3390/ijms25052879

Сироткина М.Ю.¹ ✉, Иноземцева А.В.¹, Нащекин А.В.², Нащекина Ю.А.¹

Исследование коллагеновых матриц, полученных при различных условиях фибриллообразования

¹ ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФТИ им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ ms778321@mail.ru

Аннотация. В работе сравнивали процесс фибриллообразования коллагена I типа в растворе с предобработкой при 4°C для получения равновесной системы и без неё. На основе растворов получены матрицы для культивирования клеток. Показано влияние обработки на фибриллообразование и свойства клеток.

Ключевые слова: коллаген I типа; фибриллы; тканевая инженерия; клетки роговицы SIRC.

Sirotkina M.Y.¹, Inozemtseva A.V.¹, Naschekin A.V.², Naschekina Y.A.¹

Investigation of collagen scaffolds formed under different conditions for fibril formation

¹ Institute of Cytology Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

² Ioffe Physical-Technical Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. We investigated the collagen type I fibrillogenesis in the low temperature pretreatment solution to obtain an ionic equilibrium. The scaffolds formed from collagen solutions used for cell culture. We showed that pretreatment of collagen solution influence on fibril formation and cell response.

Keywords: collagen I type; fibrils; tissue engineering; SIRC corneal cell line.

В тканях коллаген I типа присутствует в форме фибрилл — нитевидных надмолекулярных структур. Молекулы коллагена способны самопроизвольно образовывать фибриллы *in vitro* при определенных pH, ионной силе и температуре, которые достигаются путем смешивания буферного раствора и раствора коллагена. Как правило, процесс фибриллообразования проводят сразу после смешивания раствора коллагена с буферным раствором. Полученную смесь инкубируют при физиологической температуре. Однако коллаген — высокомолекулярный белок и для достижения равновесия и равномерного распределения ионов буферного раствора требуется время. Для получения равновесной системы мы предложили предварительно выдерживать раствор при пониженной температуре для предотвращения преждевременного фибриллообразования.

Цель настоящей работы состоит в исследовании влияния на свойства матриц предварительного инкубирования коллагенового раствора при 4°C для достижения ионного равновесия.

Коллаген I типа был экстрагирован из сухожилия крысы. Раствор коллагена смешивали с буферным раствором с разным значением pH и выдерживали в течение 3 часов при температуре 4°C для достижения ионного равновесия в растворе. Затем инкубировали при 30°C для осуществления фибриллообразования. Структуру матриц изучали с применением голомографического микроскопа Tomocube HT-X1. Кинетические кривые фибриллообразования фиксировали при длине волны 310 нм. На матрицах культивировали клетки линии SIRC из коллекции клеточных культур ИНЦ РАН. Скорость миграции клеток анализировали с помощью прибора прижизненной конфокальной микроскопии CQ1.

Данные образцы сравнивали с контрольными образцами без предварительного инкубирования при 4°C.

Нами было показано, что в зависимости от наличия и отсутствия предварительной инкубации при 4°C и от значения pH раствора меняется наклон экспоненциального участка кривой мутности раствора. Вместе с этим

после завершения фибриллообразования наблюдается увеличение мутности для образцов, прошедших предварительную инкубацию при 4°C, по сравнению с контрольными.

Также наблюдается рост скорости миграции клеток при увеличении pH раствора буфера для матриц, приготовленных с предварительной инкубацией растворов при 4°C. Для матриц, не прошедших предобработку, при увеличении pH буфера скорость миграции клеток не меняется.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20120).

Смажило К.Ю. ✉, Усачёв В.А., Волошин Н.С., Тюрин-Кузьмин П.А., Кулебякин К.Ю., Воронцова М.В.

Участие паракринных факторов в синхронизации ответа культуры МСК на ПТГ

МНОИ ФФМ МГУ им. М.В. Ломоносова

✉ k.y.komashko@gmail.com

Аннотация. В ходе отработки метода неконтактного сокультивирования МСК при добавлении ПТГ нами было обнаружено модулирующее действие гормона на дифференцировку клеток в остеогенном и адипогенном направлениях. При этом ПТГ оказывал противоположный эффект на МСК, выделенные из жировой ткани, и линию ASC52telo.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; МСК; ПТГ; паратиреоидный гормон; дифференцировка; межклеточная коммуникация; неконтактное сокультивирование; Transwell.

Smazhilo K.Y., Usachev V.A., Voloshin N.S., Tyurin-Kuzmin P.A., Kulebyakin K.Y., Vorontsova M.V.

The participation of paracrine factors in the synchronization of the response of the MSC culture to PTH

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. During the development of the method of non-contact co-cultivation of MSCs with the addition of PTH, we discovered the modulating effect of the hormone on cell differentiation in the osteogenic and adipogenic directions. At the same time, PTH had the opposite effect on MSCs isolated from adipose tissue and the ASC52telo line.

Keywords: mesenchymal stem cells; MSCs; PTH; parathyroid hormone; differentiation; intercellular communication; non-contact co-cultivation; Transwell.

В современном мире все больше людей, преимущественно пожилого возраста, сталкиваются с заболеваниями опорно-двигательного аппарата. В качестве одной из основных причин развития указанных заболеваний можно выделить нарушение баланса между процессами образования и резорбции костной ткани. Для лечения соответствующих патологий, связанных с разрушением костной ткани, часто применяются препараты, основанные на паратиреоидном гормоне (ПТГ) [1]. ПТГ выступает в роли гомеостатического гормона, способного оказывать воздействие на все виды костных клеток. При этом ПТГ демонстрирует двойственный профиль ответов у пациентов — способствует формированию костной ткани при периодическом введении и резорбции кости при непрерывном введении. До конца молекулярный механизм действия паратгормона неясен и требует дополнительного изучения.

Относительно недавно было установлено, что в костной ткани ПТГ вызывает разные варианты кальциевого ответа в мезенхимных стволовых клетках (МСК): осцилляции, одиночные пики и плавный прирост внутриклеточного кальция. Вариант ответа четко коррелирует с эффектом гормона на остеогенную дифференцировку в различных депо организма. Например, в надкостнице, где преобладающий вариант ответа представлен осцилляциями и одиночными пиками, ПТГ оказывает антиостеогенный эффект. А в подкожной жировой клетчатке, где большая часть клеток отвечает плавным приростом кальция, — проостеогенное [2]. Данный феномен связан с тем, что рецептор ПТГ способен связывать два G-белка и одновременно активировать одну из двух сигнальных систем — аденилатциклазную или фосфолипазную. При этом данные системы находятся в динамическом равновесии, поэтому ингибирование одной из них позволяет переключать преимущественный тип кальциевого ответа в тканях, тем самым изменяя эффект ПТГ на дифференцировку

в остеогенном направлении. Самым интересным является то, что лишь небольшой процент клеток отвечает на ПТГ, но его действие реализуется на всей популяции. Исходя из базовых знаний устройства культуры МСК, мы предполагаем, что здесь имеет место быть механизм «синхронизации ответа», обусловленный продукцией паракринных факторов. Для подтверждения или опровержения данного утверждения было решено провести эксперимент по оценке вклада паракринной сигнализации в реализацию эффекта ПТГ на процесс дифференцировки МСК при помощи модели неконтактного сокультивирования.

Исследование проводилось на культуре МСК жировой ткани, а также линии МСК человека ASC52telo в условиях неконтактного сокультивирования с использованием системы Transwell. Мы оценивали влияние паратиреоидного гормона на дифференцировочный потенциал МСК в двух классических направлениях: остеогенном и адипогенном. Успешность дифференцировки клеточной культуры в остеогенном направлении оценивали с помощью цитохимического окрашивания ализариновым красным. Дифференцировка в адипогенном направлении определялась с помощью оценки накопления жировых капель с использованием флуоресцентного красителя Nile Red, а также последующей обработкой данных с использованием Segment.ai нейронной сети из NIS.ai модуля NIS elements 5.42.02. Также проводили оценку уровня экспрессии генов остеогенеза при помощи ПЦР в реальном времени. Для оценки эффективности дифференцировки в остеогенном направлении использовались маркеры RunX и остеокальцин. Дополнительно нами был проведен ингибиторный анализ с использованием ингибиторов аданилатциклазного (SQ 22536) и фосфолипазного (U-73122) сигнальных каскадов для проверки вклада данных систем в эффективность остеогенеза.

В ходе отработки нового метода неконтактного сокультивирования мы выявили, что ПТГ при добавлении к МСК, выделенным из жировой ткани, оказывает проостеогенный и антиадипогенный эффект. При добавлении гормона к линии ASC52telo наблюдается противоположное антиостеогенное и проадипогенное действие. Анализ экспрессии генов у ASC52telo, связанных с дифференцировкой в остеогенном направлении, показал, что они были снижены в исследуемых лунках при сравнении с контрольными, в которых не было периодов добавления ПТГ. В модели неконтактного сокультивирования МСК, в которой ПТГ обрабатывались клетки только внутри вставки, клетки на дне лунки никак с гормоном не взаимодействовали, полностью воспроизводился эффект прямого добавления ПТГ. Данные результаты открывают перспективы для более детального исследования регуляторных механизмов паратиреоидного гормона.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (Проект № 19-75-30007).

Список литературы

1. Kraenzlin M., Meier C. Parathyroid hormone analogues in the treatment of osteoporosis // *Nat Rev Endocrinol.* 2011. Vol. 7, N 11. P. 647–656. doi: 10.1038/nrendo.2011.108
2. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Sozaeva L., et al. Dynamic balance between PTH1R-dependent signal cascades determines its pro- or anti-osteogenic effects on MSC // *Cells.* 2022. Vol. 11, N 21. P. 3519. doi: 10.3390/cells11213519

Смирнова Д.В. ✉, Ныров В.А., Сафарова Д.Д., Малашичева А.Б.

Роль фактора механотрансдукции KLF4 в поддержании функциональных свойств эндотелиальных клеток

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ dariaasmirnoff@gmail.com

Аннотация. Исследование изучает роль Krüppel-подобного фактора 4 (KLF4) в функциональных свойствах эндотелиальных клеток. Результаты показали, что подавление экспрессии гена KLF4 в эндотелиальных клетках снижает степень остеогенной дифференцировки остеобластов при совместном культивировании.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки; Krüppel-подобный фактор 4; сигнальный путь Notch; остеогенная дифференцировка.

Smirnova D.S., Nyrov V.A., Safarova D.D., Malashicheva A.B.

The role of mechanotransduction factor KLF4 in maintaining the phenotype of endothelial cells

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study investigates the role of Krüppel-like factor 4 (KLF4) on the functional properties of endothelial cells. The results showed that suppression of KLF4 gene expression in endothelial cells reduces the degree of osteogenic differentiation of osteoblasts in co-culture.

Keywords: endothelial cells; Krüppel-like factor 4; Notch signaling pathway; osteogenic differentiation.

Эндотелиальные клетки являются главными компонентами сосудистой системы, которые регулируют важные физиологические процессы, такие как ангиогенез, проницаемость сосудов и гемостаз. Эндотелий способен индуцировать и регулировать остеогенную дифференцировку мезенхимных клеток. Однако механизмы того, как эндотелиальные клетки взаимодействуют с мезенхимными клетками и регулируют остеогенную дифференцировку, недостаточно изучены. Исследования последних десятилетий привели к пониманию того, что члены семейства транскрипционных факторов KLF (Krüppel-like factors) участвуют в регуляции биологии эндотелия. В частности, два члена этого семейства, а именно KLF2 и KLF4, напрямую регулируют ключевые эндотелиальные гены. Кроме того, сигнальный путь Notch также управляет свойствами эндотелия. Тем не менее связь между KLF4 и сигнальным путем Notch не изучена. Поэтому важно исследовать влияние снижения экспрессии гена *KLF4* на свойства эндотелия и сам сигнальный путь Notch.

Цель исследования: оценить влияние подавления экспрессии гена *KLF4* на функциональные свойства эндотелиальных клеток.

В работе использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Подавление экспрессии гена *KLF4* проводили с помощью лентивирусных частиц, несущих малые шпилечные РНК (shKLF4). Для исследования влияния на функциональные свойства эндотелия проводили совместное культивирование эндотелиальных клеток с первичными остеобластами человека в остеодифференцировочной среде, содержащей 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β-глицерофосфата. Степень остеогенной дифференцировки оценивалась с помощью окраски ализариновым красным через 14 дней.

Подавление экспрессии гена *KLF4* в эндотелиальных клетках приводит к увеличению экспрессии эндотелиальных маркеров CD31 и vWF, что подтверждают данные ПЦР в реальном времени, а также иммуноцитохимический анализ. Данные вестерн-блоттинга показали, что введение shKLF4 в эндотелиальные клетки

приводит к снижению суммарного количества белка Notch1 и Notch3. Кроме того, совместное культивирование остеобластов и изменённых эндотелиальных клеток приводит к снижению степени остеогенной дифференцировки по сравнению с нормальным эндотелием.

Полученные данные указывают на существенную роль фактора KLF4 в эндотелии при регуляции остеогенной дифференцировки и связь с сигнальным путём Notch.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (№ проекта 23-15-00320).

Смирнова П.В. ✉, Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Баринов С.М., Комлев В.С.

Низкотемпературные покрытия на основе фосфатов кальция с альбумином на деминерализованном костном матриксе для выраженной физиологической биоминерализации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова
Российской академии наук, Москва, Россия

✉ mikheevap7@gmail.com

Аннотация. Низкотемпературным методом соосаждения дикальцийфосфат дигидрата с альбумином на деминерализованные костные матрицы получены композиционные материалы с полной физиологической внутрифибриллярной биоминерализацией с ярко выраженным остеогенным эффектом.

Ключевые слова: низкотемпературные покрытия; фосфаты кальция; композиционные материалы; деминерализованный костный матрикс.

Smirnova P.V., Smirnov I.V., Teterina A.Yu., Barinov S.M., Komlev V.S.

Low-temperature calcium phosphate coatings with albumin on demineralized bone matrix for pronounced physiological biomineralization

Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Low-temperature method of co-precipitation of dicalcium phosphate dihydrate with albumin on demineralized bone matrices obtained composite materials with complete physiological intrafibrillar biomineralization with a pronounced osteogenic effect.

Keywords: low-temperature coatings; calcium phosphates; composite materials; demineralized bone matrix.

Проведено исследование эффективности биомиметического подхода получения покрытий на основе низкотемпературных фосфатов кальция, в том числе в сочетании с сывороточным альбумином (БСА), на деминерализованном костном матриксе (ДКМ). Альбумин был выбран для соосаждения по ряду причин: он является доминирующим белком плазмы крови, составляющим около 50% общей концентрации белка в плазме крови и до 75% коллоидной активности, а также это мономерная многодоменная макромолекула, определяющая онкотическое давление плазмы и распределение жидкости между органами и тканями организма в соответствии с классическим принципом Старлинга [1]. В физиологических условиях происходит чистое перемещение альбумина из внутрисосудистого в интерстициальное пространство и обратно по лимфатическим сосудам [2]. Одновременно сам альбумин может непосредственно влиять на целостность кровеносных сосудов, связываясь с интерстициальным матриксом и субэндотелием и изменяя проницаемость этих слоев для крупных молекул и растворителей.

Предлагаемая технология создания материалов заключается в низкотемпературном методе осаждения прекурсоров гидроксиапатита, дикальций фосфат дигидрата (ДКФД), в условиях, максимально приближенных к физиологическим, по типу первичной минерализации костной ткани. Включение БСА в состав покрытия привело к лучшему и более равномерному распределению кальций-фосфатного слоя на поверхности трабекул ДКМ. На клетках MG63 было показано, что как полученные покрытия ДКФД, так и его комплекс с БСА не проявляют цитотоксичности до концентрации 10 мг/мл *in vitro*. Эктопическая (подкожная) имплантация крысам выявила выраженную биосовместимость, а также сильные остеокондуктивный,

остеоиндуктивный и остеогенный эффекты как для ДКМ + ДКФД, так и для ДКМ + ДКФД + БСА, но более выраженные эффекты для ДКМ + ДКФД + БСА. Кроме того, для образцов ДКМ + ДКФД + БСА была достигнута выраженная полная физиологическая внутрифибрилярная биоминерализация и проангиогенный эффект с формированием костномозговых ниш, сопровождающийся выраженными процессами интрамедуллярного кроветворения, что свидетельствует о мощном остеогенном эффекте данного композита [3].

По результатам проведенного исследования был сделан вывод о том, что эффективным остеопластическим материалом могут стать композитные биомиметики костной ткани, представляющие собой сбалансированный комплекс низкотемпературных фосфатов кальция (прекурсоров гидроксиапатита) и дополнительных биоактивных природных белков и липидов, нанесенных на высокоочищенный интактный и неиммуногенный внеклеточный костный матрикс с сохраненной фибриллярной структурой. Такие биомиметики костной ткани должны выступать в качестве своеобразных «праймеров» для запуска всех процессов, необходимых для регенерации костной ткани, но осуществляемых непосредственно самим организмом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-73-20251 «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани»).

Список литературы

1. Peters T. All about albumin. Genetics and medical applications. Academic Press, 1995. doi: 10.1016/B978-0-12-552110-9.X5000-4
2. Parving H.H., Gynzelberg F. Transcapillary escape rate of albumin and plasma volume in essential hypertension // *Circ Res.* 1973. Vol. 32, N 5. P. 643–652. doi: 10.1161/01.res.32.5.643
3. Minaychev V.V., Teterina A.Y., Smirnova P.V., et al. Composite remineralization of bone-collagen matrices by low-temperature ceramics and serum albumin: a new approach to the creation of highly effective osteoplastic materials // *J Funct Biomater.* 2024. Vol. 15, N 2. P. 27. doi: 10.3390/jfb15020027

Смолянинова Л.В.^{1,2} ✉, Мамедова А.Р.^{1,2}, Каримова О.^{1,2}, Скрыбин Б.В.³, Аверина О.А.^{4,5},
Попов В.С.^{1,6}, Шилова А.А.^{1,6}, Животовский Б.Д.^{1,2,7}, Копейна Г.С.^{1,2}

Каспаза-2 нокаутные мыши проявляют фенотип со сниженной репродуктивной функцией

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

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

³ Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models, University of Münster, Münster, Germany

⁴ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁵ Институт функциональной геномики МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁶ Институт регенеративной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

⁷ Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

✉ smolyaninovalaris1@gmail.com

Аннотация. Установлено снижение фертильной функции у нокаутных по гену каспазы-2 мышей инбредной линии FVB, полученных с помощью технологии CRISPR/Cas. Данный фенотип не зависит от разницы в эстральном цикле и овариальном резерве у диких и нокаутных мышей.

Ключевые слова: каспаза-2; фертильность; эстральный цикл; овариальный резерв.

Smolyaninova L.V.^{1,2}, Mamedova A.R.^{1,2}, Karimova O.^{1,2}, Skryabin B.V.³, Averina O.A.^{4,5},
Popov V.S.^{1,6}, Shilova A.A.^{1,6}, Zhivotovsky B.D.^{1,2,7}, Kopeina G.S.^{1,2}

Subfertility in female mice lacking caspase-2

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Core Facility of Transgenic Animal and Genetic Engineering Models, University of Münster, Münster, Germany

⁴ Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁵ Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁶ Institute for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

⁷ Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract. Generation of knockout caspase-2 mice were done by CRISPR/Cas technology in inbred FVB strain. Female caspase-2^{-/-} mice appear normal but show reduced fertility. This phenotype does not depend on the difference in estrous cycle and ovarian reserve in wild and knockout mice.

Keywords: caspase-2; fertility; estrous cycle; ovarian reserve.

Каспаза-2 принадлежит к семейству цистеиновых протеаз, расщепляющих белки, вовлеченные в регуляцию механизмов гибели клеток и воспаление. Каспаза-2 является одним из самых консервативных белков семейства каспаз и относится как к инициаторным, так и «исполнительным» каспазам, которые участвуют в запуске и усилении процесса апоптоза, наиболее изученного типа программируемой гибели клеток в ответ на разнообразные стимулы. Кроме апоптотической функции, каспаза-2 обладает онкосупрессорными функциями и участвует в поддержании генетической стабильности и регуляции клеточного цикла. Прокаспаса-2 содержит домен CARD (обеспечивает белок-белковое взаимодействие) и две каталитические субъединицы p19 и p12, которые при активации фермента в результате автопротеолиза формируют гетеротрамер активной каспазы. В составе белка присутствует сигнал ядерной локализации, что позволяет ей находиться в ядре, помимо цитоплазмы и аппарата Гольджи. Каспаза-2 экспрессируется в виде двух изоформ каспаза-2L и каспаза-2S, участвующих в инициации или подавлении механизмов гибели соответственно.

Участие каспазы-2 в репродуктивной функции впервые было исследовано на каспаза-2-дефицитных мышах линии C57BL, у которых были удалены экзоны, кодирующие активный сайт фермента (QACRG) и последовательность каспазы-2S, что приводило к инактивации обеих изоформ фермента (каспазы-2L и каспазы-2S). У таких мышей на 4-й день после рождения было повышено число примордиальных фолликулов, содержащих ооциты, что указывало на то, что в отсутствие каспазы-2 не наблюдается естественного снижения зародышевых клеток, происходящего у мышей на 3-й день после рождения в результате массового апоптоза этих клеток.

Нами для исследования роли каспазы-2 в репродуктивной функции половозрелых мышей с помощью CRISPR/Cas технологии были созданы нокаутные по каспазе-2 (*casp2^{-/-}*) мыши (линия FVB) (делеция 20 нуклеотидов в экзоне 5, кодирующем активный центр фермента). Для изучения фертильной функции были сформированы пары для скрещивания — самец дикого типа и самка дикого типа или нокаутная самка, которые находились вместе до момента покрытия самок самцом и образования вагинальных пробок, которые являются признаком оплодотворения. Исследуемые животные были распределены на 4 группы, различающиеся по возрасту самок: в первую группу вошли самки дикого типа (wt) ($n = 9$), во вторую группу нокаутные самки (*casp2^{-/-}*) ($n = 16$) (возраст 40–65 дней); в третью группу самки дикого типа (wt) ($n = 13$) и в четвертую группу нокаутные самки (*casp2^{-/-}*) ($n = 15$) (возраст 70–90 дней). День обнаружения вагинальной пробки считали «нулевым» днем беременности. На 7-й день беременности осуществляли вскрытие самок и проводили подсчет количества эмбрионов. У нокаутных по каспазе-2 мышей установлено заметно сниженное число беременных самок и меньшее количество эмбрионов в сравнении с диким типом. Наблюдаемый эффект не зависит от возраста нокаутных самок при сравнении группы 2 и группы 4 (31,2% и 33,3% беременных самок в каждой группе соответственно). Отсутствие возрастных изменений в количестве беременных нокаутных самок (*casp2^{-/-}*) и количестве эмбрионов в потомстве указывает на роль каспазы-2 в снижении фертильной функции, которое проявляется уже при наступлении половозрелости (40–65 дней) и сохраняется в более позднем возрасте (70–90 дней).

Нарушение фертильности может зависеть от ряда причин: изменения в эстральном цикле, быстром истощении овариального резерва, гормональной дисфункции яичников, нарушении в процессе овуляции и т.д. Исследование эстрального цикла у нокаутных самок (*casp2^{-/-}*) и самок дикого типа показало, что эстральный цикл самок дикого типа и нокаутных самок не отличается; наиболее длительными фазами цикла оказались эструс и диэструс, за месяц повторяется 4–6 циклов длительностью примерно 5–7 дней. Полученные данные указывают на то, что различие в фертильности не связано с нарушением эстрального цикла у нокаутных самок (*casp2^{-/-}*).

Исследование экспрессии генов *Zp3* и *Dazl*, как показателей овариального резерва у мышей линии FVB в возрасте 40–70 дней и 70–100 дней, не выявило разницы в их экспрессии у самок обоих генотипов как в возрастной группе 40–70 дней, так и в группе 70–100 дней. Статистически значимые различия наблюдаются между возрастными группами как самок дикого типа, так и нокаутных самок, что указывает на снижение овариального запаса с возрастом у исследуемых животных. Полученные данные свидетельствуют о том, что различие в фертильности не связано с нарушением овариального запаса у нокаутных самок (*casp2^{-/-}*).

Таким образом, разница в фертильности самок дикого типа и нокаутных *casp2^{-/-}* самок линии FVB не определяется нарушениями в эстральном цикле и изменении овариального запаса, а установление причины снижения фертильности нокаутных *casp2^{-/-}* самок требует дальнейших исследований.

Исследование поддержано грантом РФФИ 23-74-30006.

Соколова А.В. ✉, Кунеев И.К., Нащекина Ю.А., Михайлов В.М., Домнина А.П.

Разработка метода 3D-культивирования гладкомышечных клеток миометрия с использованием целлюлозной матрицы растительного происхождения

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ avokolova@inbox.ru

Аннотация. Получены гладкомышечные клетки (ГМК) миометрия мыши на целлюлозной матрице из зеленого лука, которые сохраняют характерные маркеры гладких мышц и выравниваются в основном в одном направлении. Показана принципиальная возможность создания многослойной конструкции на основе целлюлозной матрицы и ГМК.

Ключевые слова: гладкомышечные клетки; миометрий; целлюлозная матрица.

Sokolova A.V., Kuneev I.K., Nashchekina Y.A., Mikhailov V.M., Domnina A.P.

Development of a method for 3D cultivation of smooth muscle cells of the myometrium using a cellulose matrix of plant origin

Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Smooth muscle cells (SMCs) of the mouse myometrium seeded on a cellulose matrix from green onions, retain characteristic markers of smooth muscles and aligned mainly in one direction. The principal possibility of creating a multilayer structure based on a cellulose matrix and SMCs is shown.

Keywords: smooth muscle cells; myometrium; cellulose matrix.

Миометрий — это гладкомышечный слой матки, генерирующий сокращения, необходимые для таких процессов, как менструация и роды. Заболевания миометрия могут приводить к отсутствию или потере беременности на разных сроках, кроме того, миометрий вовлечен в другие патологические состояния, такие как аденомиоз и миомы матки (лейомиомы). Для изучения механизмов, лежащих в основе патологических состояний миометрия, наиболее распространенными модельными системами традиционно были модели на животных и полоски миометрия человека. Кроме того, исследования проводятся на культурах клеток, при этом большинство исследований *in vitro* включает выращивание клеток на двухмерных (2D) культуральных планшетах. Однако клетки, растущие на плоской жесткой поверхности, не позволяют воссоздать архитектуру ткани. Трехмерные матрицы позволяют контролировать выравнивание и ориентацию клеток, что играет решающую роль в функциональности ткани, особенно мышечной. Кроме того, основной функцией миометрия является сократительная, а сокращение матки — это трехмерное (3D) скоординированное явление и должно изучаться в трехмерной среде. Таким образом, остро стоит вопрос о создании именно 3D-модели миометрия *in vitro*, как для фундаментальных исследований, направленных на изучение функционирования матки, так и для медицинских целей. Работа направлена на разработку и исследование трехмерной функциональной тканеподобной модели миометрия, подходящей для фундаментальных и прикладных исследований в области акушерства, гинекологии и регенеративной биомедицины.

В последние годы для использования в регенеративной медицине набирают популярность скаффолды (матрицы), изготавливаемые из децеллюляризованных растений. Нами в качестве матриц из целлюлозы в работе были использованы перо лука и черешок сельдерея. Очистку целлюлозного каркаса от клеточного содержимого (децеллюляризацию) производили путем обработки заготовок 1%-ным раствором натрия

додецилсульфата (SDS) с последующей промывкой в PBS. Для улучшения адгезивных свойств поверхности для прикрепления клеток матрицы обрабатывали коллагеном I типа по разработанной ранее методике [1]. Гладкомышечные клетки (ГМК) получали из миометрия мышей BALB/c. Заселение целлюлозных матриц ГМК миометрия мыши проводили путем нанесения суспензии клеток на поверхность матрицы. В ГМК, культивируемых в целлюлозных матрицах и на пластике, оценивали экспрессию генов, характерных для гладких мышц. Также клетки окрашивались на соответствующие белки методом иммуногистохимии и исследовались на конфокальном микроскопе.

В ходе работы отработана методика получения децеллюляризованных целлюлозных матриц из разных частей пера лука и черешка сельдерея. Оценена структура полученных матриц, и показано отсутствие ядер клеток в целлюлозном скаффолде. Получены ГМК из миометрия мыши. Показано, что клетки жизнеспособны, пролиферируют, экспрессируют характерные для гладких мышц маркеры, такие как α -гладкомышечный актин (α SMA), трансгелин (SM22), кальпонин, тяжелые цепи миозина гладкой мышцы (SMMHC/MYH11), коннексин-43. Оценена возможность культивирования ГМК миометрия мыши на полученных целлюлозных скаффолдах. Показано, что ГМК миометрия мыши способны пролиферировать на полученных целлюлозных каркасах. При этом наиболее подходящей для моделирования мышечной ткани структурой обладает внешняя сторона зеленой части пера лука. Получены культуры ГМК миометрия мыши на целлюлозной матрице из зеленого лука, исследованы свойства полученной тканеподобной конструкции. Показано, что клетки в такой конструкции сохраняют жизнеспособность и способность к пролиферации, кроме того, сохраняются характерные маркеры гладких мышц, таких как α SMA, SM22, кальпонин, коннексин-43 и SMMHC/MYH11. При культивировании ГМК на внешней стороне целлюлозного каркаса из пера лука наблюдается выравнивание клеток преимущественно в одном направлении, задаваемом структурой матрицы, что характерно для мышечной ткани. Были соединены нескольких заселенных клетками целлюлозных каркасов методом наложения их друг на друга для создания единой многослойной конструкции. Полученная конструкция исследована методами конфокальной микроскопии, гистологии. Показано сохранение клеток между слоями матрицы, что позволяет предполагать принципиальную возможность создания многослойной конструкции на основе целлюлозной матрицы из зеленого лука и ГМК.

Таким образом, в результате выполнения работы получена трехмерная тканеподобная конструкция, состоящая из целлюлозного каркаса и ГМК, имитирующая миометрий в культуре, которая может быть использована для дальнейших исследований свойств клеток миометрия, а также различных его патологий.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 24-24-00539.

Список литературы

1. Kuneev I.K., Ivanova Y.S., Nashchekina Y.A., et al. Development of a method for three-dimensional culturing of human mesenchymal stem (stromal) cells using a cellulose matrix // *Cell Tiss Biol.* 2023. Vol. 17. P. 388–397. doi: 10.1134/S1990519X2304003X

Соловьёв Д.А.^{1,2}✉, Лапина Е.С.¹, Александрова С.А.¹, Чернета А.Е.^{1,2}, Горбач В.И.³,
Кравченко А.О.³, Ермак И.М.³, Блинова М.И.¹, Александер-Синклер Э.И.¹

***In vitro* скрининг потенциальных липосомальных систем доставки эхинохрома и ацикловира**

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток, Россия

✉ whale203@mail.ru

Аннотация. В данной работе исследовалось влияние липосом, содержащих комплекс каррагинана и эхинохрома, на клетки эпителия конъюнктивы и эпителия роговицы человека и влияние липосом, содержащих комплекс каррагинана и ацикловира, на стволовые клетки слизистой губы и дермальные фибробласты человека.

Ключевые слова: каррагинан; эхинохром; ацикловир; липосомы; цитотоксичность; адгезивность; клеточные культуры; тест-системы.

Soloviev D.A.^{1,2}, Lapina E.S.¹, Aleksandrova S.A.¹, Cherneta A.E.^{1,2}, Gorbach V.I.³, Kravchenko A.O.³,
Yermak I.M.³, Blinova M.I.¹, Aleksander-Sinkler E.I.¹

***In vitro* screening of potential liposomal delivery systems for echinochrome and acyclovir**

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

³ G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. In this work, the effects of liposomes containing carrageenan and echinochrome complex on human conjunctival and corneal epithelial cells and the effect of liposomes containing carrageenan and acyclovir complex on lip mucosal stem cells and human dermal fibroblasts were investigated.

Keywords: carrageenan; echinochrome; acyclovir; liposomes; cytotoxicity; adhesiveness; cell cultures; test systems.

Всемирной организацией здравоохранения разработаны критерии оценки лекарственных препаратов, среди которых, помимо эффективности и стоимости, важное место занимают биодоступность, приемлемость и безопасность [1]. Именно с учетом этих критериев в настоящее время разрабатываются не только новые лекарства, но и совершенствуются лекарственные формы уже используемых средств. В частности, активно разрабатываются многофункциональные системы их доставки. Липосомы — одни из наиболее исследованных наночастиц, которые рассматривают в качестве эффективных средств доставки различных препаратов с минимальными побочными эффектами [2, 3]. Как средство доставки лекарственных препаратов липосомы уже успешно применяются в различных областях медицины. Липосомальные лекарственные формы, как правило, отличаются меньшей токсичностью, возможностью адресной доставки лекарственного средства и меньшим риском развития нежелательных реакций. Большой интерес представляет разработка липосом, содержащих комплекс природных соединений морского происхождения каррагинан и эхинохром (CRG/Ech-Lip), для местного применения офтальмологии, а также липосом, содержащих каррагинановый комплекс ацикловира (CRG/Ac-Lip), для терапии ран кожи и слизистых оболочек. Вместе с тем увеличение сложности структуры лекарственного средства, как следствие, приводит к увеличению числа критических точек производства, а также к расширению списка параметров, подлежащих контролю [2]. При изучении

фармакологических и токсикологических свойств лекарственных препаратов и систем их доставки широкое применение получает *in vitro* скрининг с использованием клеточных тест-систем. Создание и использование адекватных клеточных тест-систем оценки *in vitro* биологической активности лекарств представляет большой интерес для регенеративной медицины. В нашем исследовании при разработке CRG/Ech-Lip и CRG/As-Lip проведена оценка их влияния на жизнеспособность культивируемых клеток, а также их адгезивности и возможности переноса лекарственной субстанции из липосом в клетки. В качестве тест-систем были использованы клетки конъюнктивы (Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4), эпителия роговицы (HCE), стволовых клеток слизистой губы (hLMSC) и дермальные фибробласты (DF) человека. Влияние CRG/Ech-Lip и CRG/As-Lip на жизнеспособность клеток человека изучали в условиях *in vitro* в процессе культивирования клеток при 37 °С в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в питательных средах, содержащих исследуемые комплексы или их отдельные компоненты. Контролем служили клетки, культивируемые в стандартных условиях без добавления липосом. Жизнеспособность клеток оценивали по их метаболической активности и морфологии с использованием МТТ-теста и метода световой микроскопии в процессе прижизненного наблюдения. Адгезивность липосом в отношении монослоя клеток человека изучали в условиях *in vitro* в процессе культивирования клеток в питательных средах, содержащих липосомы с включенным в них каррагинаном, несущим метку FITC. Исследование адгезивных свойств липосом проводили в двух вариантах: без предварительной обработки монослоя клеток муцином и с предварительной обработкой монослоя клеток муцином. Дополнительная обработка монослоя Chang Conjunctiva, Clone 1-5c-4 и hLMSC муцином перед анализом адгезивных свойств полисахаридных матриц была выбрана на основании литературных данных для создания *in vitro* тест-системы, приближенной к условиям организма. Адгезивность липосом и возможность переноса лекарственной субстанции из них в клетки оценивали методом флуоресцентной микроскопии. Выявлена высокая биосовместимость липосомной формы CRG/Ech-Lip с клетками и цитотоксическое действие CRG/As-Lip в отношении культивируемых клеток. Выявлено, что метка FITC детектируется в клетках, инкубированных с липосомами и их отдельными компонентами, несущими эту метку; предварительная обработка монослоя клеток муцином перед инкубированием его с CRG/Ech-Lip и CRG/As-Lip способствует усилению детектируемого сигнала, что может быть связано с увеличением адгезивности. Проведенное исследование показало, что выбранные нами клеточные тест-системы являются адекватными для первичного скрининга биосовместимости разрабатываемых липосомальных систем доставки препаратов, предназначенных для оптимизации процессов регенерации поврежденных тканей. Изучение их потенциальной эффективности — тема комплекса дальнейших исследований.

Список литературы

1. Фитилев С.Б., Шкробнева И.И., Возжаев А.В. Основы рациональной фармакотерапии. Проблемный метод преподавания клинической фармакологии. Москва: РУДН, 2017. 93 с. EDN: UDJNWX
2. Мельникова Е.В., Горячев Д.В., Чапленко А.А., и др. Разработка липосомальных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества // Вестник Российского государственного медицинского университета. 2018. №. 6. С. 35–42. EDN: YXNSXR doi: 10.24075/vrgmu.2018.092
3. Kaldybekov D.B., Tonglairoum P., Opanasopit P., et al. Mucoadhesive maleimide-functionalised liposomes for drug delivery to urinary bladder // Eur J Pharmac Sci. 2018. Vol. 111. P. 83–90. doi: 10.1016/j.ejps.2017.09.039

Соловьева Е.В.¹ ✉, Кляйн О.И.¹, Чайковская Е.А.², Пантелеев А.А.¹

Оценка ранозаживляющей способности природоподобных самоорганизующихся скаффолдов на ксенотрансплантатах кожного лоскута человека

¹ НИЦ Курчатовский институт, Москва, Россия

² Институт пластической хирургии и косметологии, Москва, Россия

✉ e.v.solovieva@gmail.com

Аннотация. На мышах NOD.Cg-Prkdc Scid/J с ксенотрансплантатами кожного лоскута человека оценены регенеративные свойства природоподобных самоорганизующихся скаффолдов.

Ключевые слова: ксенотрансплантат; ранозаживление; самоорганизующиеся скаффолды.

Solovieva E.V.¹, Klein O.I.¹, Chaikovskaya E.A.², Panteleyev A.A.¹

Wound healing properties of nature-like self-organizing scaffolds on human skin flap xenografts

¹ NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

² Institute of Plastic Surgery and Cosmetology, Moscow, Russia

Abstract. Regenerative properties of nature-like self-organizing scaffolds were evaluated on human skin flap xenografts implanted on to NOD.Cg-Prkdc Scid/J mice.

Keywords: xenograft; wound healing; self-organizing scaffolds.

Ксенотрансплантация кожного лоскута человека мышам позволяет изучать не только механизмы действия фармакологических средств на волосяные фолликулы и интерфолликулярный эпителий, но и процессы ранозаживления и регенеративные свойства биоинженерных конструкций непосредственно на коже человека. Для создания модели ранозаживления кожного лоскута человека использованы мыши NOD.Cg-Prkdc Scid/J с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (severe combined immunodeficiency — SCID), вызванным спонтанной мутацией Prkdc, приводящей к развитию толерантности Т-клеток. В качестве ксенотрансплантатов в работе использованы кожные лоскуты височной области головы человека, включающие эпидермальный и частично дермальный слои, полученные от пациенток в возрастном интервале от 42 до 80 лет, проходящих косметическую коррекцию. Было отмечено, что успешное приживление кожного лоскута и его придатков не зависит от возраста мыши или человека. Проведенные исследования показали, что критичным для приживления является период от забора экспланта у пациента до момента имплантации мышам, который не должен превышать нескольких часов. Оценка процесса приживления кожного лоскута размером ~2–3 см² показала, что длительность процесса составляет ~60 дней, потери объема ткани при ксенотрансплантации — 20%, доля сохраняемых при трансплантации волосяных фолликулов — 50–60%, скорость роста волоса — 1 см в месяц, длительность экспериментального периода, в который можно проводить тестирование биоинженерных конструкций — 9 мес, возможность ретрансплантации (многократной) трансплантации от мыши к мыши — 3–4 раза, в зависимости от размера ксенотрансплантата. С целью создания природоподобных материалов для восстановления поврежденных кожных покровов нами разработана технология получения самоорганизующихся скаффолдов из мицелия грибов класса Basidiomycetes и Kombucha (SCOBY) — симбиотического организма дрожжей (*Schizosaccharomyces pombe*) и бактерии (*Acetobacter xylinum*). Уникальные особенности производимых мицелиальных каркасов, механические

свойства и биосовместимость делают их пригодными как для регенеративной медицины, так и тканевой биоинженерии, в частности кожи. Самоорганизация скаффолда обеспечивается за счет способности грибов образовывать, в процессе роста, мицелиальный скаффолд/мат ветвящимися нитевидными многоклеточными гифами и волокнистой массой, структурно напоминающий природный внеклеточный матрикс мягких тканей млекопитающих. Многослойные мицелиальные скаффолды были получены при культивировании гименофорных клеток разных видов грибов класса Basidiomycetes, растущих на территории Курчатовского института, последовательно в агарозной, а затем в глюкозо-пептонной среде. Механические характеристики соответствовали децеллюляризированной коже человека: прочность на разрыв — 0,06–0,13 МПа, деформация при разрыве — 17–28%, модуль Юнга — 0,4–0,8 МПа. Биосовместимость скаффолдов показана на эмбриональных фибробластах мыши (NIH/3T3), фибробластах и кератиноцитах человека (линия HaCaT). Изменения в способности поддерживать кератиноцитарную стратификацию HaCaT наблюдали после обработки мицелиальных скаффолдов растворителями. Так, диметилсульфоксид (DMSO) и трихлоруксусная (TCA) кислота приводили к уплотнению скаффолдов за счет разбухания гифов, что позволяло кератиноцитам формировать базальный, шиповатый и роговой слои. Спирты же (ЕТ-этанол, IP — изопропанол), приводили к обезвоживанию гифов и тем самым более рыхлой структуре, что позволяло клеткам проникать сначала внутрь и только после заполнения скаффолда стратифицироваться, при этом плохо формируя базальный слой. Таким образом, для создания эпидермального эквивалента более подходящими выглядят скаффолды, обработанные DMSO и TCA, тогда как для полного эквивалента предпочтительнее обработанные спиртами. Для создания материалов с анимикробной активностью использовался организм *Kombucha*, в котором мицелий и бактерии симбиотически растут, создавая в процессе ферментации пленочные целлюлозосодержащие композиты с широким набором функций. Ранозаживляющая способность самоорганизующихся скаффолдов успешно протестирована на обширных кожных ранах мышей C57bl и модели ксенотрансплантата кожного лоскута человека на мышах SCID.

Солопов М.В.¹ ✉, Чечехина Е.С.², Кавелина А.С.¹, Акопян Г.В.¹, Турчин В.В.¹, Попандопуло А.Г.¹

Сегментация микрофотографий мультипотентных мезенхимных стромальных клеток с использованием нейросетевых алгоритмов

¹ Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К. Гусака, Донецк, Россия

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

✉ mxsolopov@yandex.ru

Аннотация. Модели DeepLab, SegNet и U-Net обучены методом трансферного обучения для сегментации микрофотографий ММСК. DeepLab и U-Net показывают лучшие результаты по пиксельной точности, коэффициенту Дайса и индексу Жаккарда, что делает их перспективными для автоматического анализа клеточных культур.

Ключевые слова: сегментация; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; клеточная культура; глубокое обучение; трансферное обучение; искусственная нейронная сеть; искусственный интеллект.

Solopov M.V.¹, Chechekhina E.S.², Kavelina A.S.¹, Akopian G.V.¹, Turchyn V.V.¹, Popandopulo A.G.¹

Segmentation of microphotographs of multipotent mesenchymal stromal cells using neural network algorithms

¹ V.K. Gusak Institute of Emergency and Reconstructive Surgery, Donetsk, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. DeepLab, SegNet and U-Net models are trained by transfer learning for segmentation of multipotent mesenchymal stromal cells micrographs. DeepLab and U-Net show the best results in terms of pixel accuracy, Dice coefficient and Jaccard index, which makes them promising for automatic cell culture analysis.

Keywords: segmentation; multipotent mesenchymal stromal cells; cell culture; deep learning; transfer learning; artificial neural network; artificial intelligence.

Широкий спектр источников выделения, потенциал дифференцировки, иммуномодулирующий и противовоспалительный эффекты делают мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) перспективным терапевтическим средством в регенеративной медицине [1]. Прижизненный микроскопический анализ популяций ММСК необходим для оценки морфологии, контроля дифференцировки и подсчёта клеток. Автоматизация анализа с применением методов искусственного интеллекта, в частности искусственных нейронных сетей, может служить альтернативой традиционным методам анализа изображений, которые требуют значительных временных и человеческих ресурсов [2]. Семантическая сегментация изображений с использованием нейросетевых алгоритмов позволяет точно идентифицировать и выделять отдельные клетки или группы клеток на микрофотографиях [3]. При минимальном вмешательстве оператора этот метод ускоряет анализ изображений и повышает его точность, обеспечивая автоматизацию и количественную оценку клеточных параметров.

Целью этого исследования является оценка эффективности некоторых популярных нейросетевых моделей для сегментации изображений в контексте их применения для анализа микрофотографий ММСК.

Для исследования использовался датасет микрофотографий 5 различных популяций ММСК человека. Фотографии были получены с использованием микроскопа Nikon Eclipse Ti 2 (объектив 10×). 320 изображений размером 1000×1000 пикселей были аннотированы экспертами для создания эталонного набора клеточных масок. Для аннотирования использовался сервис VGG Image Annotator [4]. В исследовании использовались

три архитектуры для сегментации изображений: DeepLab, SegNet и U-Net. Обучение моделей проводили на веб-платформе Kaggle с использованием графического процессора NVIDIA Tesla T4. Все модели были инициализированы с весовыми коэффициентами, полученными после обучения на датасете ImageNet, а затем дообучены на датасете микрофотографий ММСК. 256 изображений были использованы для тренировочной выборки, 64 — для валидационной. Обучение проводили на протяжении 85 эпох, с использованием бинарной кросс-энтропии в качестве функции потерь и оптимизатора Adam. Качество обученных моделей оценивали на валидационной выборке микрофотографий. Для каждой модели рассчитывались метрики точности сегментации: 1) пиксельная точность (ПТ) — доля пикселей, правильно отнесённых к нужным классам на изображении (фон или клетка); 2) коэффициент Дайса (КД) — показатель, оценивающий, насколько хорошо предсказанные маски совпадают с реальными, учитывая размер и форму этих масок; 3) индекс Жаккарда (ИЖ) — соотношение между областью пересечения предсказанной и реальной масок и их общей площадью, показывающее степень их совпадения. Диапазон значений всех выше указанных метрик варьирует от 0 до 1.

Модель U-Net продемонстрировала наилучшую ПТ 0,930, КД 0,863 и ИЖ 0,762, что делает её наиболее подходящей для задач сегментации микрофотографий ММСК. Модель DeepLab также показала высокие результаты, немного уступая U-Net по всем метрикам: ПТ 0,919, КД 0,843 и ИЖ 0,730. Модель SegNet продемонстрировала несколько худшие результаты по сравнению с другими моделями: ПТ 0,849, КД 0,726 и ИЖ 0,572.

Результаты исследования показали, что модели U-Net и DeepLab обладают высокой способностью к сегментации микрофотографий ММСК. Это обусловлено тем, что обе модели эффективно захватывают контекстуальную информацию и сохраняют пространственные детали, что критично для точного выделения отдельных клеток и клеточных скоплений. Скорее всего, благодаря своей архитектуре, содержащей прямые соединения, U-Net и DeepLab лучше сохраняют мелкие детали при сегментации. SegNet показала более низкие результаты, что может быть связано с особенностями её архитектуры. Она оптимизирована для экономии памяти за счёт снижения вычислительных ресурсов, что приводит к потере пространственной информации. Эта потеря важна для точной сегментации сложных клеточных структур.

Исследование продемонстрировало, что использование нейросетевых моделей, таких как U-Net и DeepLab, позволяет достичь высокой точности сегментации клеток. Эти модели могут быть рекомендованы для исследований по автоматизации анализа изображений клеточных культур в биомедицинских приложениях. Несмотря на полученные высокие показатели метрик, рассматриваемые модели требуют совершенствования для повышения точности сегментации. Дальнейшие исследования должны быть направлены на использование более объёмных датасетов, а также изучение влияния на точность сегментации различных вариантов весовых коэффициентов предобученных моделей.

Список литературы

1. Jovic D., Yu Y., Wang D., et al. A brief overview of global trends in MSC-based cell therapy // *Stem Cell Rev. Reports*. 2022. Vol. 18, N 5. P. 1525–1545. doi: 10.1007/S12015-022-10369-1
2. Kong Y., Ao J., Chen Q., et al. Evaluating differentiation status of mesenchymal stem cells by label-free microscopy system and machine learning // *Cells*. 2023. Vol. 12, N 11. P. 1524. doi: 10.3390/CELLS12111524/S1
3. Issa J., Abou Chaar M., Kempisty B., et al. Artificial-intelligence-based imaging analysis of stem cells: a systematic scoping review // *Biology*. 2022. Vol. 11, N 10. P. 1412. doi: 10.3390/BIOLOGY11101412/S1
4. Dutta A., Zisserman A. The VIA annotation software for images, audio and video. In: Amsaleg L., Huet B., Larson M.A., et al., editors. *Proceedings of the 27th ACM international conference on multimedia*. New York: ACM, 2019. P. 2276–2279. doi: 10.1145/3343031.3350535

Сорогина Д.А.^{1,2} ✉, Погосова М.А.¹, Блохин М.Е.³, Хвостов М.В.³, Павлова С.В.¹,
Лузина О.А.³, Медведев С.П.¹, Закиян С.М.¹

Создание тест-системы для оценки специфичности агонистов экспериментальных лигандов рецепторов, активируемых пероксисомными пролифераторами (PPAR) *in vitro*

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² НГУ, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский институт органической химии СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ d.sorogina@g.nsu.ru

Аннотация. Трансгенные линии CHO-K1, экспрессирующие гены hPPAR α , hPPAR γ , hPPAR δ рецепторы человека, можно использовать для изучения специфичности новых лигандов в тесте с репортерной конструкцией, содержащей PPAR связывающий мотив перед минимальным ТК промотором.

Ключевые слова: рецепторы; активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR); PPAR связывающий элемент (PPRE); фенофибрат; розиглитазон; тезаглитазар; двойной люциферазный репортерный анализ.

Sorogina D.A.^{1,2}, Pogosova M.A.¹, Blokhin M.E.³, Khvostov M.V.³, Pavlova S.V.¹, Luzina O.A.³,
Medvedev S.P.¹, Zakian S.M.¹

Creation of a test system for assessing the specificity of agonists of experimental peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligands *in vitro*

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk Institute of Organic Chemistry SB RAS, Novosibirsk, Russia

Abstract. Transgenic CHO-K1 cell lines expressing the human receptors hPPAR α , hPPAR γ , hPPAR δ can be used to study the specificity of new ligands in luciferase reporter assays with PPAR binding element upstream of the minimal TK promoter.

Keywords: peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR); PPAR response element (PPRE); fenofibrate; rosiglitazone; tesaglitazar; dual luciferase reporter assays.

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPARs) — это семейство ядерных рецепторов, действующих как транскрипционные факторы. Все три типа PPAR — PPAR α , PPAR γ , PPAR δ активируют (или ингибируют) множество генов-мишеней, поэтому их активация (ингибирование) обладает плейотропным эффектом, распространяющимся на все системы организма. Так, под действием различных лигандов PPAR α снижает сердечно-сосудистые осложнения от диабета, уменьшает концентрацию липопротеинов низкой плотности в крови и оказывает противовоспалительный эффект, PPAR γ и PPAR δ повышают чувствительность к инсулину периферических тканей [1]. Активация указанных рецепторов ведет к улучшению состояния при сахарном диабете второго типа, дислипидемии, неалкогольной жировой болезни печени и неалкогольного стеатогепатита, а также при сердечно-сосудистых и нейродегенеративных заболеваниях и других патологиях [2]. PPAR являются перспективными мишенями для лекарственных препаратов. К сожалению, многие из применяемых лекарств обладают побочными эффектами. Сейчас силы исследователей по всему миру направлены на поиск таких лекарственных лигандов, которые не являлись бы токсичными.

Существует несколько стратегий, направленных на уменьшение побочных эффектов агонистов PPAR. Воздействуя сразу на несколько типов PPAR, можно нивелировать их побочные эффекты. На данный момент были синтезированы дуальные агонисты α/β (элафибранор) и α/γ (сароглитазар) а также пан агонисты (чиглитазар), действующие на все три типа PPAR сразу [3]. Использование лигандов PPAR, содержащих в себе фрагменты природных соединений, является перспективным направлением, поскольку они уже продемонстрировали эффективность и относительную безопасность [4]. Для того, чтобы проводить первичный скрининг новых соединений, потенциальных агонистов PPAR рецепторов, возникла необходимость создания клеточной системы *in vitro* для тестирования их активности и специфичности. Для ее создания было предложено получить трансгенные линии клеток, экспрессирующие преимущественно один из типов PPAR рецепторов — альфа, гамма или дельта. Мы выбрали клетки линии CHO-K1, так как они являются хорошими родительскими клетками, которые успешно используются для наработки чужеродных белков. Для стабильной экспрессии трансгенов в клетки линии CHO-K1 вносили пары генов человека *hPPAR α /hRXR α* , *hPPAR γ /hRXR α* и *hPPAR δ /hRXR α* (формируют функциональный гетеродимер, необходимый для активации транскрипции целевых генов) с помощью векторов на основе транспозонов Sleeping Beauty (SB). Донорные плазмиды конструировали на основе pT2/HB (Addgene #26557), в которые вносили последовательности PPAR генов, дополнительно содержавших FLAG-эпитоп под CAG промотором и гены устойчивости к генетицину или гигромицину (для RXR гена). После селекции на G418 (генетицин) 1000 мкг/мл и гигромицин 500 мкг/мл были получены клеточные линии CHO-PPAR α , CHO-PPAR γ и CHO-PPAR δ . Экспрессия трансгенов PPAR была подтверждена ОТ-ПЦР анализом и вестерн-блотом с антителами к FLAG-эпиту. Специфичность активации рецепторов в родительских и трансгенных клеточных линиях была подтверждена с помощью фенофибрата, селективного агониста PPAR α , росиглитазона, селективного агониста PPAR γ и GW0742, селективного агониста PPAR δ , а также тезаглитазара — дуального агониста рецепторов PPAR α /g. В качестве репортерной конструкции мы использовали созданную нами плазмиду pDuoLucTK-PPRE, которая была получена на основе репортерного вектора pGL4.10[luc2] (Promega), кодирующего люциферазу светлячка, в который внесли PPRE элемент и минимальный ТК тимидин-киназный промотор из плазмиды PPRE X3-TK-luc (Addgene #1015), и была клонирована последовательность ДНК второй люциферазы hRluc из pGL4.70[hRluc] (конститутивно экспрессирующаяся люцифераза Renila, которая служит для нормализации трансфекции). Было показано, что в трансгенных линиях референсные агонисты PPAR работают специфично и дозозависимо. С целью поиска новых двойных агонистов PPAR α /g были синтезировали 5 соединений, в которых фармакофорная часть глитазаров связана с известным растительным веществом дигидробетулоновой кислотой через аминокислотные линкеры разной длины — C2–C6. Изучение их активности *in vitro* с использованием трансгенных линий CHO-PPAR α , CHO-PPAR γ и CHO-PPAR δ и репортерной конструкции pDuoLucTK-PPRE показало, что 2 из них (15a (C2) и 15c (C4)) являются двойными агонистами PPAR α и PPAR γ в концентрации 1 мкМ, 2 (15d (C3) и 15e (C6)) являются только агонистами PPAR γ , а соединение 15b (C5) не активировало ни один из изученных рецепторов.

Работа выполнена при поддержке Фонда научно-технологического развития Югры № 2023-566-05.

Список литературы

1. Taylor S.I., Yazdi Z.S., Beitelshes A.L. Pharmacological treatment of hyperglycemia in type 2 diabetes // J Clin Invest. 2021. Vol. 131, N 2. doi: 10.1172/JCI142243
2. Takada I., Makishima M. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and antagonists: a patent review (2014-present) // Expert Opin Ther Pat. 2020. Vol. 30, N 1. P 1–13. doi: 10.1080/13543776.2020.1703952
3. Dutta D., Bhattacharya S., Surana V., et al. Efficacy and safety of saroglitazar in managing hypertriglyceridemia in type-2 diabetes: a meta-analysis // Diabetes Metab Syndr. 2020. Vol. 14, N 6. P. 1759–1768. doi: 10.1016/j.dsx.2020.08.039
4. Günther A., Makuch E., Nowak A., et al. Enhancement of the antioxidant and skin permeation properties of betulin and its derivatives // Molecules. 2021. Vol. 26, N 11. P. 3435. doi: 10.3390/molecules26113435

Сорокина Л.Е. ✉, Красный А.М.

Регуляция цитотоксичности моноцитов: от отторжения аллотрансплантатов до лечения рака

ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», Москва, Россия

✉ leya.sorokina@mail.ru

Аннотация. Моноциты играют важную роль в реакциях отторжения аллотрансплантата и элиминации раковых клеток. Показано, что функциональный потенциал моноцитов реализуется посредством антителозависимой цитотоксичности, выраженной в экспрессии CD16. Механизм регуляции экспрессии моноцитами CD16 не ясен. В данной работе показана возможность регуляции экспрессии моноцитами CD16.

Ключевые слова: моноциты; CD16; HLA-B; антителозависимая цитотоксичность; ADCC; реакции отторжения трансплантата; онкологические заболевания.

Sorokina L.E., Krasnyi A.M.

Regulation of monocyte cytotoxicity: from allograft rejection to cancer treatment

FSBI "NMITs AGP named after V.I. Kulakov" of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Monocytes play an important role in allograft rejection reactions and cancer cell elimination. It has been shown that the functional potential of monocytes is realized through antibody-dependent cytotoxicity expressed in CD16 expression. The mechanism of regulation of CD16 expression by monocytes is unclear. This work demonstrates the possibility of regulation of CD16 expression by monocytes.

Keywords: monocytes; CD16; HLA-B; antibody-dependent cytotoxicity; ADCC; transplant rejection reactions; cancer.

Макрофаги являются эффекторными клетками врожденной иммунной системы. На данный момент появились исследования, демонстрирующие важное значение моноцитов в таких процессах, как реакции отторжения аллотрансплантата и элиминации раковых клеток. Показано, что функциональный потенциал моноцитов реализуется посредством антителозависимой цитотоксичности (ADCC) моноцитов, выраженной в экспрессии CD16, представляющего собой мембранный низкоаффинный IgG рецептор. Исследования при пересадке кожных лоскутов мыши показали, что для реакции отторжения достаточно компонентов моноцитарно-макрофагальной системы без участия лимфоцитарного звена. Также было установлено, что моноциты могут экспрессировать macrophage MHC receptors (MMRs), распознающие HLA-B [1, 2]. Была показана важность данных рецепторов для отторжения аллотрансплантата. При этом одним из факторов, характерных для отторжения трансплантатов, является повышение содержания моноцитов CD16+ [3, 4]. При изучении ADCC моноцитов на различных раковых линиях клеток *in vitro* было продемонстрировано, что для успешной реализации ADCC необходимо наличие двух факторов — экспрессии моноцитами CD16 и таргетных антител [5]. Таким образом, регуляция экспрессии CD16 может играть ключевую роль в успешной аллогенной трансплантации и лечении онкологии при использовании таргетных антител. В настоящей работе нами было проведено изучение механизмов регуляции экспрессии моноцитами рецептора CD16 у беременных женщин. Беременность можно рассматривать как успешную реализацию «трансплантации» полуаллогенного плода, при которой повышенная экспрессия CD16 связана с тяжелыми акушерскими осложнениями, такими как преэклампсия (ПЭ). В эксперименте *in vitro* установлено, что активация экспрессии CD16 моноцитами происходит при взаимодействии с растворимыми плацентарными антигенами без непосредственного

контакта «cell-to-cell». В последующем эксперименте мы показали, что экспрессию CD16, индуцированную плацентарными антигенами, полностью блокирует рекомбинантный комплекс гистосовместимости HLA-B. Таким образом, данное проведенное исследование показывает возможность регулирования экспрессии CD16 как в сторону ее увеличения, так и блокирования, что может иметь прикладное значение для ряда социально значимых заболеваний, связанных с ADCC: от решения проблемы отторжения аллотрансплантатов до лечения рака.

Список литературы

1. Shimizu T., Tashiro-Yamaji J., Hayashi M., et al. HLA-B62 as a possible ligand for the human homologue of mouse macrophage MHC receptor 2 (MMR2) on monocytes // *Gene*. 2010. Vol. 454, N 1–2. P. 31–38. doi: 10.1016/j.gene.2010.01.007
2. Tashiro-Yamaji J., Shimizu T., Hayashi M., et al. Specific binding of HLA-B44 to human macrophage MHC receptor 1 on monocytes // *Gene*. 2012. Vol. 501, N 2. P. 127–134. doi: 10.1016/j.gene.2012.04.020
3. van den Bosch T.P., Caliskan K., Kraaij M.D., et al. CD16+ monocytes and skewed macrophage polarization toward M2 type hallmark heart transplant acute cellular rejection // *Front Immunol*. 2017. Vol. 8. P. 346. doi: 10.3389/fimmu.2017.00346
4. Vereyken E.J., Kraaij M.D., Baan C.C., et al. A shift towards pro-inflammatory CD16+ monocyte subsets with preserved cytokine production potential after kidney transplantation // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, N 7. doi: 10.1371/journal.pone.0070152
5. Yeap W., Wong K., Shimasaki N., et al. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes // *Sci Rep*. 2016. Vol. 6. doi: 10.1038/srep34310

Спасельникова А.В.¹✉, Попик Е.А.¹, Копылова И.В.^{1,2}, Казакова А.Н.¹, Скородумова Л.О.¹, Шендер В.О.^{1,3}, Арапиди Г.П.^{1,3,4}, Лагарькова М.А.¹, Богомазова А.Н.^{1,2}, Лебедева О.С.^{1,2}

Новые потенциальные мишени LRRK2 — белки, взаимодействующие с нуклеиновыми кислотами

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

² Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия

⁴ Московский физико-технический институт, Москва, Россия

✉ spaselnikova@gmail.com

Аннотация. На изогенной клеточной модели болезни Паркинсона, вызванной мутацией G2019S в киназе LRRK2, с помощью омиксных технологий были определены потенциальные мишени LRRK2 и подтверждена их экспрессия в клетках изогенной системы на разных этапах дифференцировки.

Ключевые слова: болезнь Паркинсона; ИПСК; Crispr/cas9; дофаминергические нейроны; LRRK2; субстраты.

Spaselnikova A.V.¹, Popik E.A.¹, Kopylova I.V.^{1,2}, Kazakova A.N.¹, Skorodumova L.O.¹, Shender V.O.^{1,3}, Arapidi G.P.^{1,3,4}, Lagarkova M.A.¹, Bogomazova A.N.^{1,2}, Lebedeva O.S.^{1,2}

New potential targets of LRRK2 are proteins that interact with nucleic acids

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University), Dolgoprudny, Russia

Abstract. Using an isogenic cell model of Parkinson's disease caused by the G2019S mutation in LRRK2 kinase, potential LRRK2 targets were identified using omics technologies and their expression was confirmed in isogenic cells at different stages of differentiation.

Keywords: Parkinson's disease; iPSCs; Crispr/cas9; dopaminergic neurons; LRRK2; substrates.

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера, поражая приблизительно 1–2% населения старше 60 лет и 4% старше 85 лет. Клинически БП характеризуется ригидностью, брадикинезией, тремором, постуральной неустойчивостью, деменцией и депрессией. Патологически БП определяется селективной дегенерацией дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга. Этиология БП, вероятно, является многофакторной, но точный молекулярный механизм, лежащий в основе патогенеза заболевания, остается неясным. На сегодняшний день описано 22 гена, мутации в которых вызывают БП, среди которых есть ген LRRK2, ответственный за аутосомно-доминантную форму БП [1]. Мутации в гене LRRK2 являются наиболее частой моногенной причиной БП как с ранним, так и поздним началом клинической манифестации. Среди мутаций в гене LRRK2 замена G2019S, расположенная в домене протеинкиназы, кодируемом экзоном 41, является наиболее распространенной и составляет 1% спорадических и 4% семейных случаев БП. Замена G2019S приводит к усилению киназной активности LRRK2, предположительно затрагивая метаболические пути [2]. В нашей лаборатории методом CRISPR/Cas9 была получена изогенная клеточная модель БП на основе

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). В состав модели входят ИПСК с нокаутом гена *LRRK2*, гетерозиготной мутацией, исправленной мутацией, гомозиготной мутацией и делецией гена *LRRK2*. На зрелых постмитотических дофаминергических нейронах, дифференцированных из изогенных ИПСК, мы провели фосфопротеомный, протеомный и транскриптомный анализ. При функциональном анализе транскриптома и протеома были выявлено, что в нейронах с мутацией G2019S наблюдается повышенная экспрессия генов, связанных с метаболизмом нуклеиновых кислот. В результате фосфопротеомного анализа был получен список из 12 белков, фосфорилирование которых повышается с возрастанием дозы мутантного аллеля, и некоторые из которых связаны с метаболизмом нуклеиновых кислот, а именно: *Frizzled3*, *DDX51*, *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC*. По литературным данным *Frizzled3* является субстратом киназы *LRRK2* [3], а для белков *DDX51*, *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC* есть информация о том, что они являются партнерами киназы [4, 5], и мы предполагаем, что они также могут являться субстратами киназы *LRRK2*. Методом количественной ОТ-ПЦР показан высокий уровень экспрессии генов *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC* в ИПСК, нейроэпителии и нейрональных предшественниках вентрального среднего мозга. Таким образом, наша изогенная клеточная модель на основе ИПСК может быть использована для изучения роли белков *DDX46*, *DHX29*, *LIG3* и *PRKDC* в качестве потенциальных субстратов *LRRK2*, участвующих в патогенетических процессах при БП.

Данная работа поддержана грантом 075-15-2019-1669 Министерства науки и высшего образования РФ.

Список литературы

1. Bouhouche A., Tibar H., Ben El Haj R, et al. *LRRK2* G2019S mutation: prevalence and clinical features in moroccans with Parkinson's disease // *Parkinsons Dis*. 2017. Vol. 2017. doi: 10.1155/2017/2412486
2. Nguyen A., Tsika E., Kelly K., et al. Dopaminergic neurodegeneration induced by Parkinson's disease-linked G2019S *LRRK2* is dependent on kinase and GTPase activity // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020. Vol. 117, N 29. P. 17296–17307. doi: 10.1073/pnas.1922184117
3. Onishi K., Tian R., Feng B., et al. *LRRK2* mediates axon development by regulating *Frizzled3* phosphorylation and growth cone–growth cone communication. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020. Vol. 117, N 30. P. 18037–18048. doi: 10.1073/pnas.1921878117
4. Zhang L., Li X. DEAD-box RNA helicases in cell cycle control and clinical therapy // *Cells*. 2021. Vol. 10. N 6. P. 1540. doi: 10.3390/cells10061540
5. Dächsel J., Taylor J., Mok S., et al. Identification of potential protein interactors of *Lrrk2* // *Parkinsonism Relat Disord*. 2007. Vol. 13, N 7. P. 382–385. doi: 10.1016/j.parkreldis.2007.01.008

Сперанская Е.М.¹ ✉, Голубцова Н.Н.¹, Скворцова Е.В.², Москвичев Е.В.¹,
Москвичев В.В.³, Фахрутдинова К.Ф.¹

Особенности межклеточных взаимодействий клеток эпителия десны человека при пародонтите

¹ ФГБОУ ВО «Чувашский государственный университет имени И.Н. Ульянова», Чебоксары, Россия

² ООО «ЭКОДЕНТ», Чебоксары, Россия

³ БУ «Больница скорой медицинской помощи» Минздрава Чувашии, Россия

✉ katerina_dumspirospero@mail.ru

Аннотация. Представлено исследование межклеточных взаимодействий клеток эпителия десны при пародонтите и после лечения диодным лазером пациентов в возрасте 20–40 лет. В эпителии десны после лазера пролиферация эпителиоцитов связана с укреплением межклеточных контактов.

Ключевые слова: пролиферация; Ki-67; E-кадгерин; пародонтит; регенерация.

Speranskaya E.M.¹, Golubtsova N.N.¹, Skvortsova E.V.², Moskvichev E.V.¹,
Moskvichev V.V.³, Fakhrutdinova K.F.¹

Features of intercellular interactions of human gingival epithelium cells in periodontitis

¹ The Chuvash State University named after I.N. Ulyanov, Cheboksary, Russia

² ECODENT LLC, Cheboksary, Russia

³ BU "Emergency Hospital" of the Ministry of Health of Chuvashia, Cheboksary, Russia

Abstract. A study of intercellular interactions of gingival epithelial cells in periodontitis and after diode laser treatment of patients aged 20–40 years is presented. In the gingival epithelium after laser, epithelial cell proliferation is associated with the strengthening of intercellular contacts.

Keywords: proliferation; Ki-67; E-cadherin; periodontitis; regeneration.

Пролиферация составляет один из факторов гистогенеза любой ткани. За счет клеточного обновления достигается способность ткани быть адаптированной к различным условиям жизнедеятельности, например к условиям хронического воспаления. Лазерная терапия, применяемая в стоматологической практике, обеспечивает регенерацию тканей при воспалительных заболеваниях пародонта [1]. Молекулы E-кадгерина участвуют в адгезии, определяют архитектуру и дифференцировку эпителиоцитов [2].

Цель исследования. Изучить особенности межклеточных взаимодействий клеток многослойного эпителия десны при пародонтите и при пародонтите после воздействия диодным лазером у людей 20–40 лет.

Материалы и методы исследования. Изучение многослойного эпителия проведено с использованием иммуногистохимических — Ki-67 (1:400, Dako), E-кадгерин (RTU, Leica), статистических методов (корреляционный анализ Спирмена, rS).

Материал исследования — биоптаты десны, полученные по медицинским показаниям. В качестве объекта исследования были выбраны пациенты в возрасте от 20 до 40 лет с хроническим пародонтитом и пародонтитом после лечения диодным лазером. Пародонтальные карманы пациентов с пародонтитом обрабатывали диодным лазером Prometey (Spectrum International, США) с длиной волны 940 нм трехкратно в 3 посещения. Биопсийный материал у пациентов был взят после проведения лазеротерапии и закрытого кюретажа в третье посещение.

Результаты исследования. При хроническом пародонтите наблюдалось угнетение пролиферации клеток базального и шиповатого слоев многослойного эпителия десны. Воздействие диодного лазера способствовало увеличению доли пролиферирующих эпителиоцитов. При хроническом воспалении пародонта наблюдалось уменьшение интенсивности окрашивания межклеточных контактов. Вероятно, это связано с нарушением патогенными микроорганизмами, такими как *Porphyromonas gingivalis*, процессов межклеточной адгезии эпителиоцитов десны [3]. В результате происходит разрушение эпителиального барьера десны и ускорение воспалительной реакции [4].

При проведении корреляционного анализа установлено, что имеет место обратная заметная взаимосвязь между долей Ki-67⁺ эпителиоцитов и долей межклеточных контактов с сильной реакцией на E-кадгерин в шиповатом слое в десне при пародонтите ($rS = -0,53$; $p < 0,05$). Таким образом, в 20–40 лет в десне с хроническим воспалением при уменьшении пролиферативной активности эпителиоцитов происходит увеличение межклеточных контактов с сильной экспрессией на E-кадгерин.

Проведение корреляционного анализа выявило, что имеется прямая слабая взаимосвязь между долей Ki-67⁺ эпителиоцитов и долей межклеточных контактов с сильной реакцией на E-кадгерин в базальном слое ($rS = 0,11$; $p < 0,05$). Таким образом, в 20–40 лет в десне с хроническим воспалением после воздействия лазера при увеличении пролиферативной активности эпителиоцитов происходит увеличение межклеточных контактов с сильной экспрессией на E-кадгерин.

Заключение. В возрасте 20–40 лет в эпителии десны с хроническим воспалением угнетение пролиферативной активности клеток базального и шиповатого слоев сопровождается укреплением межклеточных контактов за счет компенсаторных механизмов. В эпителии десны после лазерного облучения пролиферативная активность клеток базального и шиповатого слоев сопровождается укреплением межклеточных взаимодействий. Корреляционный анализ показал, что у пациентов в возрасте от 20 до 40 лет в эпителии десны в условиях лазерного воздействия пролиферация эпителиоцитов связана с укреплением межклеточных контактов.

Список литературы

1. Sağlam M., Köseoğlu S., Pekbağrıyanık T., et al. Effects of high power-pulsed Nd: YAG laser irradiation on the release of transforming growth factor-beta (TGF-β) and vascular endothelial growth factor (VEGF) from human gingival fibroblasts // *J Cosmet Laser Ther.* 2017. Vol. 19, N 8. P. 469–474. doi: 10.1080/14764172.2017.1342042
2. Bugueno I.M., Batool F., Keller L., et al. *Porphyromonas gingivalis* bypasses epithelial barrier and modulates fibroblastic inflammatory response in an *in vitro* 3D spheroid model // *Sci Rep.* 2018. Vol. 8, N 1. doi: 10.1038/s41598-018-33267-4
3. Groeger S., Meyle J. Oral mucosal epithelial cells // *Front Immunol.* 2019. Vol. 10. P. 208. doi: 10.3389/fimmu.2019.00208.
4. Yost S., Duran-Pinedo A.E., Krishnan K., et al. Potassium is a key signal in host-microbiome dysbiosis in periodontitis // *PLoS Pathog.* 2017. Vol. 13, N 6. doi: 10.1371/journal.ppat.1006457

Спирина Л.В. ✉, Зиннурова А.Б., Бакина О.В., Воробьев К.П.

Биохимические особенности воздействия холодной плазмы на фибробласты человека

Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

✉ spirinalv@mail.ru

Аннотация. Цель исследования заключалась в исследовании апоптоза, метаболического статуса в культуре 3Т3 под воздействием холодной плазмы. Выявлен гормезисный эффект ХП, связанный с ее дозой. Кроме того, отмечено, что равновесие между окислительным фосфорилированием и гликолизом под действием ХП на клеточную культуру 3Т3 сместилось на сторону гликолиза.

Ключевые слова: холодная плазма; метаболический эффект; ПОЛ; апоптоз; некроз; МТТ тест; ЛДГ;

Spirina L.V., Zinnurova A.B., Bakina O.V., Vorob'ev K.P.

Biochemical features of cold plasma action in human fibroblasts

Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

Abstract. The aim of this study was to investigate apoptosis and the metabolic state of 3T3 cells in response to cold plasma exposure. The findings revealed a hormetic response to CP, which correlated with its dose. Additionally, it was observed that the balance between oxidative phosphorylation and glycolysis in 3T cells shifted towards glycolysis when exposed to CP.

Keywords: cold plasma; metabolic effect; peroxide oxidation; apoptosis; necrosis; MTT test; LDH.

В настоящее время изучаются действия внешних факторов как физической, так и химической природы, которые способны реализовывать широкий спектр эффектов внутри клеток и во внеклеточном пространстве [1]. В этом контексте огромный интерес представляет собой так называемая холодная плазма (ХП) — это ионизированный газ, имеющий температуру до 40°C, но высокую энергию электронов. Из-за низкой температуры такого вида плазмы есть огромный потенциал ее использования на биообъектах.

До сих пор остаются неизвестны точные механизмы действия холодной плазмы на разные системы внутри клеток. Действие ХП очень варьируется в зависимости от дозы облучения, используемого газа, условий, при которых проводится облучение и от типа клеток, подвергающиеся воздействию ХП [2].

В связи с этим изучаются биохимические механизмы достижения таких эффектов ХП на живые системы. Цель исследования заключалась в определении уровня апоптоза, показателей перекисного окисления липидов, жизнеспособности и метаболического статуса. В клеточных культурах нормальных фибробластов мыши 3Т3 будут находиться под воздействием холодной плазмы при разной длительности экспозиции.

Материал и методы исследования. Клетки эмбриональных фибробластов мыши (3Т3) инкубировали в питательной среде ДМЕМ/F-12 (1:1) с добавлением L-глутамин, НЕРЕС (15mM/l) дополненной фетальной бычьей сывороткой и антибиотиком (БиолоТ, Россия). Для облучения клеток использовали экспериментальную установку низкотемпературной плазмы атмосферного разряда с убегающими электронами (atmospheric Discharge with Runaway Electrons — DRE). Апоптоз измеряли с помощью аннексии V-FITC и йодид пропидия. Аннексин V связывает фосфатидилсерин, перемещающийся из внутренней мембраны клетки во внешнюю. Клетки на ранней стадии апоптоза идентифицируются как положительные по аннексину V и отрицательные по красителю пропидий йодиду. Содержание малонового диальдегида (МДА) определяли по развивающейся окраске между МДА и 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) при высокой температуре и кислом значении рН. Активность каталазы оценивали по скорости разложения перекиси

водорода за определённое время инкубации смеси при температуре +37. Активность каспазы-3 оценивали по диссоциации желтой группы р-нитроанилида под действием каспазы-3 с образованием развивающейся розовой окраски при длине волны 405 нм. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ теста. Лактатдегидрогеназа (ЛДГ) катализирует реакцию образования лактата из пирувата с одновременным окислением НАДН + Н. Измерение оптической плотности проводилось на спектрофотометре при длине волны 340 нм. Интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью двухфотонного микроскопа с временным разрешением (FLIM) (MPTflex, Jena, Germany).

Результаты исследования и их обсуждение. Показано, что эффекты ХП зависят от ее дозы, особенностей функционирования клетки, что и соответствует гормезисному эффекту ХП. При облучении культуры клеток нормальных фибробластов мыши 3Т3 ХП оказывала стимулирующий эффект, что приводило к увеличению жизнеспособных клеток, с одной стороны, и снижению апоптоза и некроза, с другой стороны, по мере увеличения продолжительности облучения. Этот эффект достаточно известен в современном мире и активно используется в косметологии и регенеративной медицине.

Тем не менее, даже при стимулирующем действии ХП на клеточную культуру 3Т3, клетки находятся в состоянии окислительного стресса. Это подтверждается увеличением содержания универсального показателя состояния перекисного окисления липидов — МДА и снижением активности одного из главных антиоксидантных ферментов клеток — каталазы. Снижение активности каталазы может быть связано с разрушением структуры фермента под действием высокоэнергетических частиц в холодной плазме. Такое подавление активности каталазы может приводить к увеличению концентрации перекиси водорода в клетках и, как следствие, к увеличению окислительного стресса и апоптоза. При исследовании метаболического статуса культуры клеток нормальных фибробластов отмечено, что равновесие между окислительным фосфорилированием и гликолизом под действием ХП на клеточную культуру 3Т3 сместилось на сторону гликолиза, что опять-таки подтверждается увеличением активности фермента ЛДГ по мере увеличения экспозиции ХП. Таким образом, холодная плазма при одинаковой дозе облучения проявляет стимулирующий эффект в культуре клеток 3Т3.

Заключение. Отмечены биохимические особенности жизнедеятельности клеток различного происхождения, развивающиеся под воздействием холодной плазмы. Показано, что активация процессов перекисного окисления липидов, окислительного стресса и снижение жизнеспособности клеток, с одной стороны, и запуск пролиферации, с другой, сопровождает данное воздействие. При воздействии холодной плазмы на клеточные культуры 3Т3 отмечено повышение активности ЛДГ и преобладание свободной формы НАД(Ф)Н + Н.

Список литературы

1. Оловяникова Р.Я., Макаренко Т.А., Лычковская Е.В., и др. Химические механизмы действия холодной плазмы на клетки // *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020. Т. 5, № 4. С. 104–116. EDN: AW00OP doi: 10.23946/2500-0764-2020-5-4-104-115
2. Ermakov A.M., Ermakova O.N., Afanasyeva V.A., et al. Dose-dependent effects of cold atmospheric argon plasma on the mesenchymal stem and osteosarcoma cells *in vitro* // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 13. P. 6797. doi: 10.3390/ijms22136797
3. Shan K., Feng N., Zhu D., et al. Free docosahexaenoic acid promotes ferroptotic cell death via lipoxygenase dependent and independent pathways in cancer cells // *Eur J Nutr*. 2022. Vol. 61, N 8. P. 4059–4075. doi: 10.1007/s00394-022-02940-w

Старкова Т.Ю. ✉, Синенко С.А., Томилин А.Н.

Роль негистонового белка HmgB1 в метаболизме эмбриональных стволовых клеток мыши

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ t.starkova@incras.ru

Аннотация. В ходе исследования в HmgB1-дефицитных эмбриональных стволовых клетках выявлены фенотипические проявления митохондриальной дисфункции, выраженные в изменении структуры митохондрий и митохондриального потенциала, накоплении АФК, увеличении уровня гликолиза и активации антиоксидантной системы клеток.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки; негистоновый хромосомный белок HmgB1; дифференцировка клеток; метаболизм клеток.

Starkova T.Y., Sinenko S.A., Tomilin A.N.

Role of HmgB1 protein in metabolism of mouse embryonic stem cells

Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study shows that loss of HmgB1 function leads to phenotypic manifestations of mitochondrial dysfunction, including an altered mitochondria structure and potential, accumulation of ROS, an increase in the level of glycolysis, and activation of the antioxidant system of cells.

Keywords: embryonic stem cells; non-histone chromosomal protein HmgB1; cell differentiation; cell metabolism.

Целью работы является исследование индивидуальной и совместной роли негистоновых белков хроматина семейства HmgB (от англ. High Mobility Group) в поддержании плюрипотентного статуса клеток, метаболизме и дифференцировке эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мыши. Актуальность данной тематики исследования обусловлена необходимостью дополнения и систематизации сведений литературных источников о роли данных белков в ЭСК вследствие выявленной корреляции уровня экспрессии данных белков и скорости пролиферации этих клеток, условий протекания большей части молекулярных механизмов хронического воспаления и регенерации, распространения метастаз, скорости роста злокачественных образований. В рамках поставленных целей нами была создана линейка ЭСК, мутантных в генах *HmgB1* и *HmgB2*. Мы показали, что CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут гена *HmgB1* не приводит к утрате жизнеспособности и способности этих клеток к направленной дифференцировке *in vitro* и в составе тератом. Однако отсутствие функции HmgB1 влияет на метаболизм ЭСК, что проявляется в активации гликолиза и антиоксидантной системы. Вероятно, повышенный уровень гликолиза в этих клетках является следствием нарушения митохондриальных функций. Фенотипически это проявляется в изменении структуры митохондрий и митохондриального потенциала, а также в накоплении АФК. Известно, что продолжительное воздействие АФК приводит к угнетению способности ЭСК к дифференцировке. Согласно полученным данным, скорость и эффективность дифференцировки *HmgB1*^{-/-} ЭСК действительно заметно снижены. *HmgB2*^{-/-} ЭСК, напротив, характеризуются снижением уровня АФК, а также увеличением скорости пролиферации в ходе дифференцировки этих клеток. Полученные данные свидетельствуют о противоположно направленных функциях белков HmgB1 и HmgB2 в регуляции активности митохондриальной сети ЭСК.

Гранты: Работа выполнена на базе лаборатории молекулярной биологии стволовых клеток Института цитологии и поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1075, от 28 сентября 2021 г., № 415/21-23 НИР от 15.10.2021.

Степанова О.В.¹ ✉, Фурса Г.А.^{1,2}, Чадин А.В.¹, Воронова А.Д.¹, Карсунцева Е.К.¹, Андреева С.С.¹, Шишкина В.С.¹, Степаненко А.А.¹, Решетов И.В.³, Чехонин В.П.^{1,2}

Трансплантация генно-клеточных конструкций на основе клеток обонятельной выстилки, экспрессирующих нейротрофические факторы, как новая стратегия лечения пациентов с кистами спинного мозга

¹ ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» МЗ РФ, 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

✉ sms-34@yandex.ru

Аннотация. Трансплантация в кисты спинного мозга генно-клеточных конструкций, экспрессирующих BDNF, NGF и NT-3, приводила к уменьшению размеров кист и улучшению двигательной активности. Применение таких конструкций в комплексной терапии пациентов с кистами спинного мозга может быть крайне перспективно.

Ключевые слова: нейротрофический фактор мозга; фактор роста нервов; нейротрофин-3; обкладочные клетки обонятельной выстилки; аденовектор; трансдукция; кисты спинного мозга; генно-клеточная терапия; регенеративная медицина.

Stepanova O.V.¹, Fursa G.A.^{1,2}, Chadin A.V.¹, Voronova A.D.¹, Karsuntseva E.K.¹, Andretsova S.S.¹, Shishkina V.S.¹, Stepanenko A.A.¹, Reshetov I.V.³, Chekhonin V.P.^{1,2}

Transplantation of gene-cell constructs based on olfactory cells expressing neurotrophic factors as a new treatment strategy for patients with spinal cord cysts

¹ The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia

² N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ University Clinical Hospital No. 1, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Transplantation of gene-cell constructs expressing BDNF, NGF and NT-3 into spinal cord cysts resulted in a decrease in cyst size and improvement of motor activity. The use of such constructs in complex therapy of patients with spinal cord cysts may be extremely promising.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor; nerve growth factor; neurotrophin-3; olfactory ensheathing cells; adenovector; transduction; spinal cord cysts; gene-cell therapy; regenerative medicine.

Посттравматические кисты спинного мозга сдавливают спинной мозг, препятствуют проведению нервных импульсов и нейрорегенерации. Существующие хирургические и медикаментозные методы лечения не позволяют в полной мере добиться выздоровления пациентов. Одним из перспективных направлений в этой области является генно-клеточная терапия. В качестве клеточной составляющей перспективны обкладочные клетки обонятельной выстилки. Их трансплантация может способствовать ремиелинизации поврежденных аксонов и восстановлению двигательных функций, снижать риск нарушений после травмы посредством секреции клетками нейротрофических факторов [1, 2]. Известно, что нейротрофический фактор мозга (BDNF), фактор роста нервов (NGF) и нейротрофин-3 (NT-3) вызывают нейропротективные эффекты, способствуя

выживаемости нейронов и регенерации аксонов в поврежденном спинном мозге [3]. Однако уровень экспрессии нейротрофических факторов в хронической фазе повреждения спинного мозга значительно снижен. Повысить его можно путем трансдукции клеток аденовекторами с трансгенами нейротрофических факторов. Целью данной работы является оценка эффективности трансплантации генно-клеточных конструкторов, экспрессирующих BDNF, NGF и NT-3, как нового метода лечения пациентов с кистами 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. Все исследования были одобрены Локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ. Из обонятельной выстилки человека были получены обкладочные клетки по разработанным нами протоколам [4]. Была проведена трансдукция клеток аденовекторами Ad5RGD-CAG-BDNF, Ad5RGD-CAG-NGF и Ad5RGD-CAG-NT-3, Ad5RGD-CAG-EGFP в качестве контроля. В тестах *in vitro* проводили выявление оптимальной нагрузки вирусными частицами при трансдукции обкладочных клеток. Также проводили оценку экспрессии и секреции обкладочными клетками нейротрофических факторов *in vitro* и *in vivo* после трансдукции с помощью ИФА. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после экспериментальной травмы спинного мозга крыс. Генно-клеточные конструкторы трансплантировали в кисты по 750 тысяч трансдуцированных клеток, экспрессирующих BDNF ($n = 10$), NGF ($n = 10$), NT-3 ($n = 10$), EGFP ($n = 10$). Также контрольной группе вводили DMEM/F12 ($n = 10$). Оценивали эффективность трансплантации в течение 1 месяца с помощью тестов BBB и МРТ. В работе было показано, что трансдукция обкладочных клеток обонятельной выстилки аденовекторами Ad5RGD-CAG-BDNF, Ad5RGD-CAG-NGF и Ad5RGD-CAG-NT-3 способствует значительному увеличению экспрессии нейротрофических факторов по сравнению с нетрансдуцированными клетками *in vitro* и *in vivo*. Через месяц после трансплантации генно-клеточных конструкторов в кисты было выявлено, что уменьшение размера кист обусловлено клеточным компонентом разработанных конструкторов. Трансплантация генно-клеточного конструктора, экспрессирующего NGF, способствовала значимому улучшению двигательной активности задних конечностей по сравнению с эффектом нетрансдуцированных клеток в первую неделю после трансплантации. Трансплантация генно-клеточного конструктора, экспрессирующего BDNF, способствовала улучшению двигательной активности задних конечностей через 4 недели после трансплантации. Трансплантация генно-клеточного конструктора, экспрессирующего NT-3, не способствовала улучшению двигательной активности задних конечностей крыс. Дальнейшее получение и исследование генно-клеточных конструкторов на основе обкладочных клеток — важный этап в разработке комплексной высокоэффективной терапии пациентов с посттравматическими кистами спинного мозга. Однако оптимальный генно-клеточный конструктор для лечения пациентов не выявлен.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания 124020800066-3.

Список литературы

1. Nakhjavan-Shahraki B., Yousefifard M., Rahimi-Movaghar V., et al. Transplantation of olfactory ensheathing cells on functional recovery and neuropathic pain after spinal cord injury; systematic review and meta-analysis // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, N 1. P. 325. doi: 10.1038/s41598-017-18754-4
2. Stepanova O.V., Voronova A.D., Chadin A.V., et al. Efficiency of human olfactory ensheathing cell transplantation into spinal cysts to improve mobility of the hind limbs // *Stem Cells Dev*. 2019. Vol. 28, N 18. P. 1253–1263. doi: 10.1089/scd.2019.0092
3. Keefe K., Sheikh I., Smith G. Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of spinal cord injury // *Int J Mol Sci*. 2017. Vol. 18, N 3. P. 548. doi: 10.3390/ijms18030548
4. Патент РФ на изобретение № 2676142 / 26.12.2018. Чехонин В.П., Степанова О.В., Решетов И.В., и др. Способ получения препарата обкладочных клеток обонятельной выстилки млекопитающих для лечения травм спинного мозга. EDN: RSQELT

Степанов П.С.¹✉, Седуш Н.Г.¹, Крупнин А.Е.¹, Алексанян М.М.², Аганесов А.Г.², Чвалун С.Н.¹

Влияние механической нагрузки на гидролитическую деградацию межтелового кейджа из полилактида

¹ Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

² Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия

✉ p.s_stepanov@mail.ru

Аннотация. Исследована гидролитическая деградация прототипов межтеловых кейджей на основе полилактида при действии механической нагрузки, характерной для поясничного отдела позвоночника. Установлено, что нагрузка ускоряет деградацию, что необходимо учитывать при разработке биodeградируемых кейджей.

Ключевые слова: межтеловой кейдж; полилактид; гидролитическая деградация.

Stepanov P.S.¹, Sedush N.G.¹, Krupnin A.E.¹, Aleksanyan M.M.², Aganesov A.G.², Chvalun S.N.¹

Effect of mechanical stress on the hydrolytic degradation of polylactide interbody cage

¹ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

² Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. Hydrolytic degradation of polylactide-based interbody cage prototypes under mechanical load typical for the lumbar spine was studied. It was found that the load accelerates degradation, which should be considered when developing biodegradable cages.

Keywords: interbody cage; polylactic acid; hydrolytic degradation.

Межтеловые кейджи широко применяются в спинальной хирургии при проведении спондилодеза — операции, направленной на обездвиживание смежных позвонков за счёт их сращения. В настоящее время эти изделия изготавливают из металлов, керамики и полимеров. Практика применения кейджей из таких материалов показала, что в ряде случаев наблюдаются осложнения, такие как псевдоартроз, проседание и миграция имплантата и др. Поэтому актуальной задачей является разработка биodeградируемого кейджа, который будет обеспечивать сращивание двух позвонков и разлагаться, замещаясь на костную ткань [1]. Одним из наиболее перспективных материалов для создания такого кейджа является полилактид — биоразлагаемый и биосовместимый полимер, который уже длительное время успешно применяется для изготовления медицинских изделий и скаффолдов. Для разработки эффективного кейджа важно выбрать полилактид с оптимальными характеристиками (молекулярная масса, соотношение L- и D-звеньев молочной кислоты и др.), обеспечивающими необходимый профиль деградации. Кроме того, необходимо принять во внимание высокую нагрузку, которую испытывает изделие после установки в организм. Этот фактор может привести к преждевременному разрушению кейджа, что нарушит стабильность сегмента и может привести к несращению позвонков. Однако вопрос влияния нагрузки на кинетику деградации полилактида практически не исследован.

Для исследования влияния внешней механической нагрузки на скорость деградации поли(L-лактида) методом 3D-печати мы изготовили прототипы кейджей в виде трубок. Образцы печатали из PLA-прутка REC 3D ($M_w = 170$ кДа, $PDI = 2,3$) на 3D-принтере Creality Ender. Высота трубки 10 мм, внешний диаметр 15 мм, толщина 2 мм. Для обеспечения нагрузки полученные изделия фиксировали на болтах между 2 шайбами,

далее с помощью динамометрического ключа предельного типа закручивали гайку, устанавливая на ключе крутящий момент затягивания 87 ± 1 Н·м, тем самым добивались внешней нагрузки на образец, равной 1060 ± 10 Н, что соответствует напряжению 24 ± 1 МПа. Изделия помещали в буферный раствор (рН = 7,4) при температуре инкубирования 55°C , имитирующей ускоренные испытания. В варианте исследования деградации без нагрузки трубки просто погружали в буферный раствор. В ходе эксперимента раствор регулярно обновляли для поддержания рН, а гайки подкручивали для сохранения заданного уровня нагрузки. В назначенные временные точки (2, 6, 14, 21, 28 дней) трубки извлекали из буферного раствора и проводили анализ молекулярной массы полилактида методом гель-проникающей хроматографии.

Установлено, что без нагрузки молекулярная масса полилактида снижается на 50% за 8 дней инкубирования, в то время как под действием нагрузки процесс гидролиза идет быстрее и аналогичное снижение наблюдается через 6 дней после начала эксперимента. На 21-й день инкубирования среднечисловая молекулярная масса образцов, деградировавших под нагрузкой, снизилась на 95%, а деградировавших без нагрузки — на 87%. Для аппроксимации полученных экспериментальных данных и расчета констант скорости гидролиза использовали модель случайного автокаталитического гидролиза. Рассчитанные константы скорости реакции составили $1.2 \cdot 10^{-4}$ (моль $^{-1}$ ·м 3) $^{1/2}$ ·день $^{-1}$ при отсутствии внешней механической нагрузки и $1.7 \cdot 10^4$ (моль $^{-1}$ ·м 3) $^{1/2}$ ·день $^{-1}$ при внешнем механическом напряжении 24 ± 1 МПа. Их отношение составляет 1.4, а коэффициент влияния внешней механической нагрузки $\gamma = (3.7 \pm 0.1) \cdot 10^{-5}$ Дж/(моль·Па).

На основе полученных данных можно сделать вывод, что внешняя механическая нагрузка приводит к ускорению деградации полилактида, при этом влияние этого фактора на профиль снижения молекулярной массы можно назвать незначительным. Однако в отдельных участках изделия молекулярная масса может снижаться гораздо быстрее, чем в среднем по изделию, что может приводить к возникновению гетерогенности, образованию микротрещин и микропустот в импланте и в итоге существенно повлиять на сроки сохранения прочности изделия, как показано в работе [2]. Поэтому требуется проведение дальнейших более глубоких исследований в этой области.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках госзадания РНЦХ им. Б.В. Петровского FURG-2022-0010 (договор № 665-ЗА-24-НИР от 14.06.2024). Для изготовления кейджей использовано оборудование Центра аддитивных и виртуальных технологий НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Спирин О.А., Аганесов А.Г., Алексанян М.М. и др. Методы фиксации и шейного спондилодеза при шейной дискэктомии // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2024. Т. 19, № 1. Р. 115–120. EDN: KNRRSQ doi: 10.25881/20728255_2024_19_1_115
2. Wang P.J., Ferralis N., Conway C., et al. Strain-induced accelerated asymmetric spatial degradation of polymeric vascular scaffolds // Proc Natl Acad Sci USA. 2018. Vol. 115, N 11. P. 2640–2645. doi: 10.1073/pnas.1716420115

Стрельникова Е.А. ✉, Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Абаленихина Ю.В., Никифоров А.А., Никифорова Л.В., Поваров В.О., Суров И.Ю., Калинина А.Р.

Особенности митохондриальной активности первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов при моделировании нитрозативного стресса *in vitro*

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

✉ nina_mzhavanadze@mail.ru

Аннотация. Моделирование нитрозативного стресса изменяет митохондриальную (метаболическую) активность культур интактных и патологических HUVEC с достижением статистически значимых межгрупповых различий при использовании пероксинитрита в концентрациях 1, 100 и 500 мкМ при времени экспозиции 30 минут.

Ключевые слова: нитрозативный стресс; пероксинитрит; культура HUVEC; МТТ-тест.

Strelnikova E.A., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Korotkova N.V., Abalenikhina Yu.V., Nikiforov A.A., Nikiforova L.V., Povarov V.O., Surov I.Yu., Kalinina A.R.

Features of mitochondrial activity of primary cultures of intact and pathological endothelial cells during modeling of nitrosative stress *in vitro*

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. Modeling of nitrosative stress changes the mitochondrial (metabolic) activity of cultures of intact and pathological HUVECs with the achievement of statistically significant intergroup differences when using peroxynitrite at concentrations of 1, 100 and 500 μM with an exposure time of 30 minutes.

Keywords: nitrosative stress; peroxynitrite; HUVEC culture; MTT test.

Процесс нитрозилирования играет двойственную роль, как положительную — участвует в процессах клеточного иммунитета, регуляции активности ферментов системы клеточной сигнализации, так и отрицательную — участвует в развитии эндотелиальной дисфункции, окислительного стресса клеток и тканей. Пероксинитрит (ONOO^-) представляет собой промежуточный метаболит, представляющий собой высоко реакционноспособную молекулу с непродолжительным периодом жизни, которая синтезируется в организме человека из супероксид-анион радикала и оксида азота (II). Он способен модифицировать структуру молекул путем образования активных форм кислорода и азота, следствием чего может явиться изменение активности ферментов и жизнедеятельности клетки [1]. Целью исследования стала оценка метаболической (митохондриальной) функции первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов при моделировании нитрозативного стресса *in vitro* с использованием пероксинитрита.

Первичные культуры интактных эндотелиоцитов HUVEC выделяли в лаборатории клеточных технологий ЦНИЛ ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по модифицированному протоколу Crampton et al., 2007 [2]. Первичные культуры патологических эндотелиоцитов получали с использованием моделирования баллонной ангиопластики способом, адаптированным в лаборатории и представленным коллективом авторов в рамках текущего Конгресса. Для эксперимента использовали четыре линии первичных культур интактных и патологических HUVEC третьего пассажа, которые культивировались в питательной среде Cell Application (кат. номер 211-500). Нитрозативный стресс моделировали добавлением в лунки 96-луночных планшетов

(SPL Lifesciences, кат. номер 30096) пероксинитрита в концентрациях 1;10;50;100;250 и 500 мкМ с инкубацией в течение 30, 60 и 120 минут, при температуре 37 °С и 5% содержании CO₂. При помощи МТТ-теста проводилась оценка метаболической (митохондриальной) активности культур клеток при воздействии пероксинитрита. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). Светопоглощение с измерением оптической плотности оценивали через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для микропланшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

В модели нитрозативного стресса с использованием пероксинитрита была выявлена измененная метаболическая (митохондриальная) активность первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов. Внутригрупповой анализ в первичной культуре интактных HUVEC показал статистически значимые различия средних значений оптической плотности при инкубации с пероксинитритом в концентрации 250 мкМ при экспозиции 30 и 60 мин — 0,221 (0,199; 0,344) и 0,156 (0,149; 0,28) соответственно ($p = 0,014$), 30 и 120 мин — 0,221 (0,199; 0,344) и 0,146 (0,135; 0,302) соответственно ($p = 0,001$). Внутригрупповой анализ в первичной культуре патологических HUVEC показал статистически значимые различия средних значений оптической плотности при инкубации с пероксинитритом в концентрации 500 мкМ при экспозиции 30 и 120 мин — 0,155 (0,1105; 0,204) и 0,226 (0,209; 0,2425) соответственно ($p = 0,032$). Межгрупповой анализ показал статистически значимые различия средних значений оптической плотности в первичных культурах интактных и патологических эндотелиоцитов в контрольных группах (без воздействия пероксинитрита) — 0,201 (0,1735; 0,259) и 0,167 (0,1485; 0,1875) соответственно ($p = 0,037$), при концентрации пероксинитрита 1 мкМ при экспозиции в течение 30 мин — 0,255 (0,2205; 0,27025) и 0,166 (0,1455; 0,19) соответственно ($p = 0,006$), при концентрации пероксинитрита 100 мкМ при экспозиции в течение 30 мин — 0,2255 (0,202; 0,2755) и 0,171 (0,1535; 0,1855) соответственно ($p = 0,001$), при концентрации пероксинитрита 500 мкМ при экспозиции в течение 30 мин — 0,269 (0,2165; 0,34075) и 0,155 (0,1105; 0,204) соответственно ($p = 0,007$).

Моделирование нитрозативного стресса с использованием пероксинитрита изменяет митохондриальную активность первичных культур эндотелиоцитов; использование пероксинитрита в концентрациях 1, 100 и 500 мкМ при экспозиции в течение 30 минут позволяет достичь статистически значимых различий метаболической (митохондриальной) активности первичных культур интактных и патологических эндотелиоцитов HUVEC *in vitro*.

Список литературы

1. Arese M., Xhani M., Sprovera B., et al. Nitro-oxidative stress and mitochondrial dysfunction in human cell lines exposed to the environmental contaminants PFOA and BPA // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022. Vol. 27, N 10. P. 292. doi: 10.31083/j.fbl2710292
2. Crampton S.P., Davis J., Hughes C.C. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) // *J Vis Exp*. 2007. N 3. P. 183. doi: 10.3791/183

Стрельцова М.А. ✉, Деев С.М., Коваленко Е.И.

Генетическая модификация NK-клеток модульным CAR для лечения HER2-позитивного рака молочной железы

Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

✉ mstreltsova@mail.ru

Аннотация. Двухкомпонентная система химерного рецептора CAR позволяет быстро изменять антигенную специфичность и контролировать активность CAR-клеток. В данной работе мы показали работоспособность BsCAR-NK-92-клеток на примере лизиса HER2-позитивного рака молочной железы при добавлении специфичного к HER2 модуля.

Ключевые слова: NK-клетки; генетическая модификация; иммунотерапия; CAR; барстар-барназа; универсальный CAR; рак молочной железы.

Streltsova M.A., Deyev S.M., Kovalenko E.I.

Genetic modification of NK cells with modular CAR for the treatment of HER2-positive breast cancer

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry RAS, Moscow, Russia

Abstract. The two-component chimeric CAR receptor system allows rapid alteration of antigen specificity and control of CAR cell activity. In this work, we demonstrated the performance of BsCAR-NK-92 cells using the example of HER2-positive breast cancer lysis by adding the HER2-specific module.

Keywords: NK cells; genetic modification; immunotherapy; CAR; barstar-barnase; universal CAR; breast cancer.

CAR-NK-клетки имеют несколько преимуществ, которые делают их перспективными для разработки продуктов “off-the-shelf”. В отличие от CAR-T-клеток, CAR-NK-клетки не нуждаются в HLA-соответствии и могут быть получены из аллогенных источников без серьезных побочных эффектов [1]. Кроме того, доступна цитотоксически-активная NK-клеточная линия NK-92, которая оказалась безопасной при введении в организм человека после облучения [2]. Использование клеточной линии NK-92 для создания CAR-NK-клеток значительно снижает производственные затраты по сравнению с использованием аутологических CAR-T-клеток, что способствует дальнейшим исследованиям в этой области. Однако по-прежнему требуется создание масштабного банка CAR-NK-92-клеток с различной антигенной специфичностью. Коммерческая ценность производства “off-the-shelf” клеток, нацеленных на редкие антигены, ограничена необходимостью постоянного пополнения криобанка и сложного процесса хранения, транспортировки и распределения в многочисленные медицинские учреждения. Недавно была разработана новая стратегия с использованием двухкомпонентных систем CAR, которые позволяют быстро изменять антигенную специфичность и контролировать активность CAR-клеток [3]. Создание клеток с переключаемыми CAR устраняет такие проблемы, как длительное ожидание пациентами получения специфичных CAR-клеток, обеспечивает возможность одновременного введения смесей модулей, нацеленных на разные антигены, и позволяет регулировать уровень цитотоксичности и чувствительность системы CAR к антигену. Для создания сменных модулей в переключаемых CAR разрабатывается множество различных молекул. Одна из них основана на системе высокоаффинного комплекса токсина барназы и антитоксина барстара. В данном исследовании использовалась ранее разработанная система переключаемого CAR, в которой на поверхности клетки экспрессируется барстар (BsCAR) [3]. Барназу можно связывать с различными антигенами, что позволяет нацеливать один

и тот же BsCAR на разные опухолевые антигены. Кроме того, путем замены комплементарного модуля можно регулировать активность BsCAR-клеток и предотвращать их гиперактивацию. Таким образом, использование BsCAR в сочетании со специфическими модулями обеспечивает универсальный подход для контролируемой многоцелевой адаптивной иммунотерапии. В данной работе барназу объединили с разработанным белком анкириновых повторов (DARPin), специфичным к опухолевому антигену HER2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2), получив белок DARPin-барназа (DARPin-Bn). Линия NK-92 была успешно трансдуцирована химерным рецептором BsCAR. Эффективность трансдукции была подтверждена с помощью проточной цитометрии к внеклеточному участку BsCAR IgG4. Наличие на поверхности BsCAR участка барстара было показано путем специфического связывания с FAM-меченной барназой. Было показано, что добавление модуля вызывает специфический лизис HER2-позитивных опухолевых клеток с помощью BsCAR-NK-92-линии. Таким образом, были получены модифицированные CAR-NK-92-клетки, способные нацеливаться на различные опухолевые антигены. На примере антигена к HER2-позитивному раку молочной железы был показан специфический лизис HER2-позитивных клеточных линий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2024-536.

Список литературы

1. Liu E., Marin D., Banerjee P., et al. Use of CAR-transduced natural killer cells in CD19-positive lymphoid tumors // *N Engl J Med*. 2020. Vol. 382, N 6. P. 545–553. doi: 10.1056/NEJM0A1910607
2. Williams B.A., Law A.D., Routy B., et al. A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy // *Oncotarget* 2017. Vol. 8, N 51. P. 89256–89268, doi: 10.18632/ONCOTARGET.19204.
3. Stepanov A.V., Kalinin R.S., Shipunova V.O., et al. Switchable targeting of solid tumors by BsCAR T cells // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2022. Vol. 119, N 46. doi: 10.1073/PNAS.2210562119

Суббот А.М., Емец Е.В., Сафонова Т.Н., Зайцева Г.В. ✉

Опыт 3D-культивирования клеток слезной железы человека

ФГБНУ НИИ глазных болезней имени М.М. Краснова, Москва, Россия

✉ g.zaytseva@niigb.ru

Аннотация. В работе представлен опыт культивирования эпителиоморфных и фибробластоподобных клеток слезной железы в 3D-культуре, пригодных для дальнейших работ по моделированию состояния хронического дакриoadенита.

Ключевые слова: клеточная модель; первичная культура слезной железы; сфероид; дакриoadенит.

Subbot A.M., Emets E.V., Safonova T.N., Zaytseva G.V.

The experience of 3D-cultivation of human lacrimal gland cells

Krasnov Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russia

Abstract. The article describes the process of culturing epitheliomorphic and fibroblast-like cells from the lacrimal glands in a 3D environment, which is suitable for future research into the development of chronic dacryoadenitis conditions.

Keywords: cell model; primary culture of the lacrimal gland; spheroid; dacryoadenitis.

Слезная железа (СЖ) относится к трубчато-ацинарным экзокринным железам. Она является основным органом иммунной системы глазной поверхности. В ее секрете присутствуют разнообразные белки: иммуноглобулины, лактоферрин, лизоцим, пероксидаза, фосфолипаза, дефенсины и др. [1]. Эпителии СЖ представлены несколькими типами клеток — ацинарные, протоковые и миоэпителиальные. Для эффективного функционирования этого органа необходимо правильное трехмерное распределение и взаимодействие составляющих ее компонентов и окружающей ниши. Так, формирование СЖ в эмбриогенезе связано с взаимодействием конъюнктивального эпителия и периокулярной мезенхимы и регулируется как генетическими механизмами, так и ферментными и гормональными системами вкпе с экзогенными факторами [2].

Дисфункция слезной железы с формированием хронического дакриoadенита встречается в офтальмологической практике примерно в 6% случаев [3]. Клинические проявления хронического поражения СЖ различной этиологии похожи, что затрудняет применение патогенетически обоснованного лечения и требует дифференциальной диагностики.

In vitro модель СЖ может помочь в поиске эффективного лечения дисфункции этого органа. Получение клеток СЖ в виде культуры не всегда является успешным. Вероятно, это связано с необходимостью трехмерного распределения клеток, повторяющего их взаиморасположение в нативной нише, которое требуется для их выживания и пролиферации.

Целью работы стала разработка протокола получения 3D-культуры клеток слезной железы для последующего моделирования состояния хронического дакриoadенита.

Образцы ткани СЖ, полученные в ходе устранения пролапса СЖ при блефаропластике, подвергали механической и ферментативной диссоциации, заседали на культуральный пластик, обработанный фибронектином. Через неделю культивирования первым этапом снимали холодным трипсином клетки фибробластного морфотипа, вторым — эпителиоморфные — теплым трипсином. Клетки пассировали на конфокальные чашки, смешивая клеточный осадок с матригелем в соотношении 1:1. Эпителиоморфные клетки культивировали в бессывороточной среде DMEM с содержанием глюкозы 1 г/л с добавлением добавки В-27, 10 нг/мл EGF и аскорбиновой кислоты 50 мкг/мл. Фибробластоподобные клетки — в среде DMEM/F12

с 5% FBS, добавкой ITS и 10 нг/мл EGF. Апробированный протокол позволил получить 3D-культуры клеток СЖ двух типов. Эпителиоморфные клетки после недели культивирования в матрикеле формировали сфероидоподобные структуры, состоящие из 5–20 клеток. При окрашивании кальцеином-АМ и гомодимером этидия сфероиды демонстрировали высокую выживаемость клеток, составляющую в среднем 92%. Фибробластоподобные клетки из СЖ не формировали сфероиды, а показывали тенденцию к выстраиванию сетчатой структуры в толще матрикса. Выживаемость этого типа клеток также была высокой — в среднем 98%. Таким образом, удалось получить жизнеспособные 3D-культуры клеток СЖ двух типов, пригодные для дальнейших работ по моделированию хронического дакриoadенита.

Список литературы

1. Massie I., Spaniol K., Barbian A., et al. Development of lacrimal gland spheroids for lacrimal gland tissue regeneration // *J Tissue Eng Regen Med*. 2018. Vol. 12. P. e2001– e2009. doi: 10.1002/term.2631
2. Jeong S.Y., Choi W.H., Jeon S.G., et al. Establishment of functional epithelial organoids from human lacrimal glands // *Stem Cell Res Ther*. 2021. Vol. 12, N 1. P. 247. doi: 10.1186/s13287-021-02133-y
3. Сафонова Т.Н., Зайцева Г.В. Клеточные технологии как основа разработки регенераторных принципов лечения заболеваний слезной железы // *Вестник офтальмологии*. 2024. Т. 140, № 2–2. С. 158–165. EDN: BWJDFD doi: 10.17116/oftalma2024140022158

Суров И.Ю. ✉, Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Стрельникова Е.А., Никифорова Л.В., Никифоров А.А., Поваров В.О., Захаров А.С., Калинина А.Р.

Изменения метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики *in vitro*

ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

✉ nina_mzhavanadze@mail.ru

Аннотация. Моделирование баллонной ангиопластики *in vitro* с последующим выделением и культивированием первичных линий HUVEC характеризуется статистически значимыми изменениями метаболической и миграционной активности культур клеток.

Ключевые слова: баллонная ангиопластика; эндотелиоциты; первичная культура клеток; миграционная активность; HUVEC.

Surov I.Yu., Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Korotkova N.V., Strelnikova E.A., Nikiforova L.V., Nikiforov A.A., Povarov V.O., Zakharov A.S., Kalinina A.R.

Changes in the metabolic and migration activity of the primary culture of endothelial cells in the balloon angioplasty model *in vitro*

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

Abstract. Modeling of balloon angioplasty *in vitro* with subsequent isolation and cultivation of primary HUVEC lines is characterized by statistically significant changes in the metabolic and migratory activity of cell cultures.

Keywords: balloon angioplasty; endothelial cells; primary cell culture; migration activity assay; HUVEC.

Ежегодно количество эндоваскулярных вмешательств на артериях различных бассейнов увеличивается, что обуславливает необходимость более активного проведения клинических и доклинических исследований медицинских изделий и препаратов, задействованных в периоперационном периоде. Моделирование баллонной ангиопластики *in vitro* с получением первичных культур клеток, метаболизм и миграционная активность которых соответствовала бы патологическим условиям, развивающимся в клинической практике, является существенным подспорьем для специалистов в сосудистой биологии и практической медицине.

Целью исследования стала оценка метаболической и миграционной активности первичной культуры эндотелиоцитов в модели баллонной ангиопластики *in vitro*.

После подписания донором информированного согласия участки пуповины длиной 12–15 см забирались в стерильную транспортную среду, содержащую 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (кат.номер А073п). Пуповина обрабатывалась 70% спиртом и подготавливалась к дальнейшей работе. Выполнялась катетеризация пуповинной вены, последняя трижды промывалась DPBS (кат.номер P061E). Далее проводился эксперимент: в пуповинную вену устанавливался гидрофильный проводник, по которому заводился баллонный катетер. Затем пуповинная вена расширялась под давлением 10 атмосфер баллонным катетером для дилатации сосудов, используемым в рутинной клинической практике, таким как Mustang Balloon Dilatation Catheter. Поскольку в среднем диаметр пуповинной вены составил от 5 до 6,5 мм, что соответствует данным литературы [1], был использован баллонный катетер диаметром 6 мм [2]. Катетер раздували до номинального давления в связи с тем, что в вене отсутствует развитый мышечный слой, для которого было бы необходимо использовать некомплаентный баллон или большее

давление в комплаентном баллоне, который был использован. Кроме того, давление, близкое к давлению разрыва, согласно инструкции, повышало бы риск разрыва стенки вены. После моделирования баллонной ангиопластики первичные культуры эндотелиоцитов HUVEC выделяли по модифицированному протоколу Crampton et al., 2007 [3]. Далее с первичными культурами HUVEC третьего пассажа в количестве трёх линий проводили МТТ тест и анализ миграционной активности при помощи теста заживления царапины (scratch test). В качестве контроля использовались интактные первичные культуры HUVEC.

Проведение МТТ теста выявило статистически значимые различия в метаболической активности интактных первичных культур клеток и после моделирования баллонной ангиопластики *in vitro*: средние значения оптической плотности растворов через 30 минут ($p = 0.037$) составили 0.27 (0.2–0.33) ЕОП и 0.24 (0.18–0.31) ЕОП, через 60 минут ($p = 0.981$) — 0.22 (0.14–0.34) ЕОП и 0.22 (0.15–0.29) ЕОП, через 120 минут ($p = 0.427$) — 0.23 (0.13–0.33) ЕОП и 0.23 (0.13–0.33) ЕОП соответственно. Тест заживления царапины (scratch test) показал, что миграционная активность культур эндотелиоцитов различалась следующим образом: скорость заживления зоны повреждения в интактной и тестовой группах через 24 часа ($p = 0.656$) составила 23.49 (19.78–27.47) мкм/ч и 20.91 (14.5–26.37) мкм/ч, через 48 часов ($p = 0.001$) — 19.15 (13.58–23.51) мкм/ч и 7.7 (1.5–12.17) мкм/ч соответственно.

Таким образом, моделирование баллонной ангиопластики *in vitro* при помощи рутинно доступных инструментов и методов позволяет в короткие сроки получать первичные культуры эндотелиоцитов с измененной метаболической и миграционной активностью, что может использоваться при доклинических исследованиях.

Список литературы

1. Капитан Т.В. Пропедевтика детских болезней с уходом за детьми. Москва: МЕДпресс-информ, 2009. 703 с. EDN: QLPYNP
2. Sarembock I.J., LaVeau P.J., Sigal S.L., et al. Influence of inflation pressure and balloon size on the development of intimal hyperplasia after balloon angioplasty. A study in the atherosclerotic rabbit // *Circulation*. 1989. Vol. 80, N 4. С. 1029–1040. doi: 10.1161/01.cir.80.4.1029
3. Crampton S.P., Davis J., Hughes C.C. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) // *J Vis Exp*. 2007. N. 3. P. 183. doi: 10.3791/183

Суровцева М.А.¹✉, Ким И.И.¹, Бондаренко Н.А.¹, Краснер К.Ю.^{1,2}, Чепелева Е.В.¹,
Бгатова Н.П.¹, Трунов А.Н.², Черных В.В.², Повещенко О.В.¹

Стромальные клетки, выделенные из лентикул после операции ReLEx SMILE, восстанавливают прозрачность роговицы мышей после травмы

¹ НИИ клинической и экспериментальной лимфологии — филиал Института цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России, Новосибирский филиал, Новосибирск, Россия

✉ mfelde13@yandex.ru

Аннотация. Фибробласты выделяли из ReLEx SMILE лентикул и дифференцировали в кератоциты, которые использовали для терапии травмы стромы роговицы мышей. Терапия клетками способствовала восстановлению толщины и прозрачности роговицы, улучшению структурной организации коллагеновых волокон стромы.

Ключевые слова: кератоциты; фибробласты роговицы; травма роговицы; толщина роговицы; прозрачность роговицы; диаметр фибрилл; плотность упаковки фибрилл; межфибрилярное расстояние.

Surovtseva M.A.¹, Kim I.I.¹, Bondarenko N.A.¹, Krasner K.Yu.^{1,2}, Chepeleva E.V.¹, Bgatova N.P.¹,
Trunov A.N.², Chernykh V.V.², Poveshchenko O.V.¹

Stromal cells isolated from lenticules after ReLEx SMILE surgery restore the transparency of the mouse cornea after injury

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

² Novosibirsk Branch of S. Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Novosibirsk, Russia

Abstract. Fibroblasts were isolated from ReLEx SMILE lenticules, differentiated into keratocytes, and used to treat corneal stromal injury in mice. Cell therapy restored corneal thickness and transparency and improved the structural organization of collagen fibrils in the stroma.

Keywords: keratocytes; corneal fibroblasts; corneal injury; corneal thickness; corneal transparency; fibril diameter; fibril density; nearest interfibrillar distance.

Прозрачность стромы роговицы зависит от небольшого диаметра коллагеновых фибрилл, их параллельного расположения и регулярного межфибрилярного расстояния [1, 2]. Травмы роговицы вызывают дифференцировку кератоцитов в фибробласты, которые секретируют измененные компоненты внеклеточного матрикса и вызывают нарушение структуры стромального матрикса. Эти патоморфологические изменения стромы могут носить необратимый характер и приводить к развитию помутнения роговицы [3, 4]. В тяжелых случаях для лечения роговичной слепоты используется процедура трансплантации донорской роговицы. Дефицит донорской роговицы во всем мире способствует развитию альтернативных подходов к лечению роговичной слепоты. Для восстановления прозрачности роговицы используют различные типы стволовых клеток и клетки роговицы. Однако применение стромальных клеток роговицы в клеточной терапии также ограничено дефицитом донорского материала. Лентикулы роговицы человека, полученные после хирургической коррекции миопии методом RELEX SMILE, могут являться оптимальным источником стромальных клеток, поскольку остаются в большом количестве от прооперированных условно здоровых доноров.

Цель исследования — изучение терапевтической эффективности интрастромального введения клеток роговицы, полученных из RELEX SMILE лентикул человека, в восстановлении прозрачности роговицы мышей после механической травмы.

Фибробласты роговицы культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 2 мМ L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина. Дифференцировку фибробластов роговицы в кератоциты проводили в селективной среде KGM. Эксперимент проводили на самках мышей линии C57BL/6 ($n = 64$) возраста 7–8 недель. Было сформировано 4 экспериментальные группы ($n = 16$, в каждой группе): группа травма (без лечения); группа с введением физиологического раствора, группа с введением кератоцитов и группа с введением фибробластов. Под наркозом (Золетил-100 30мг/кг и Рометар 0.25 мг/кг) острой иглой в центральной оптической зоне одного глаза формировали тоннельный дефект в толщу роговицы. Фибробласты или кератоциты ($2,5 \times 10^4$ в 2 мкл физиологического раствора) вводили в травмированную строму роговиц мышей. Оценка функциональных показателей роговицы перед созданием травмы и каждые 2 недели в течение всего срока наблюдения выполняли с помощью оптической когерентной томографии и биомикроскопии переднего отрезка глаза на щелевой лампе с флуоресцеиновой пробой. Кератокан, люмикан, α -SMA, коллаген I и III в исследуемых образцах выявляли иммунофлуоресцентным окрашиванием. Для трансмиссионной электронной микроскопии образцы роговиц забирали через 2, 4 и 8 недель после травмы. Морфометрию проводили на цифровых изображениях с помощью программного обеспечения Image J.

После дифференцировки кератоциты экспрессировали кератокан, люмикан и основной компонент стромы роговицы — коллаген I. Формирование стромальной травмы у мышей было подтверждено накоплением флуоресцеина при биомикроскопии роговицы на щелевой лампе и развитием реактивного отека стромы роговицы по данным ОКТ. Через 2 недели после нанесения травмы наблюдалась полная эпителизация раневой поверхности, увеличение толщины роговицы и формирование стойкого помутнения роговицы, которое сохранялось до конца эксперимента ($p < 0.05$). В группах без введения клеток (травма и физиологический раствор) толщина и индекс помутнения (ИП) посттравматических роговиц на всем сроке наблюдения (2, 4, 6 и 8-й неделе) были значимо выше по сравнению со здоровой роговицей ($p < 0.05$). Через 8 недель после травмы в строме роговиц этих групп выявлено наличие коллагена III и α -SMA-положительных клеток. Для групп с введением клеток (кератоцитов или фибробластов) начиная со 2-й недели после травмы отмечено уменьшение толщины роговицы, которая через 8 недель после травмы была сопоставима с толщиной здоровой роговицы. В группе с введением кератоцитов ИП начинал снижаться со 2-й недели наблюдения и через 8 недель после травмы был сопоставим с соответствующим показателем здоровой роговицы. Для группы с введением фибробластов выявлена более медленная динамика восстановления прозрачности роговицы. Снижение ИП было отмечено только после 6 недель наблюдения и к 8-й неделе наблюдения показатель уже не отличался от ИП здоровой роговицы. Формирование стромальной травмы сопровождалось уменьшением диаметра коллагеновых фибрилл стромы, увеличением их плотности и минимального ближайшего межфибриллярного расстояния в течение всего срока наблюдения. Интрастромальное введение клеток после травмы приводило к снижению плотности коллагеновых фибрилл, увеличению их диаметра и минимального ближайшего расстояния между ними. Фибриллы были хорошо упорядочены, сохраняли ближний порядок и количество ближайших соседей, хотя среднее расстояние между ними увеличивалось.

Таким образом, показано что клеточная терапия стромальными клетками роговицы из ReLEx SMILE лентикул является эффективным подходом для восстановления прозрачности роговицы. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-25-00020.

Список литературы

1. Benedek G.B. The theory of transparency of the eye // *Appl Optics*. 1971. Vol. 10, N 3. P. 459–473. doi: 10.1364/AO.10.000459
2. Hassell J.R., Birk D.E. The molecular basis of corneal transparency // *Exp Eye Res*. 2010. Vol. 91, N 3. P. 326–335. doi: 10.1016/j.exer.2010.06.021
3. Espana E., Birk D.E. Composition, structure and function of the corneal stroma // *Exp Eye Res*. 2020. Vol. 198. doi: 10.1016/j.exer.2020.108137
4. Fukuda K. Corneal fibroblasts: function and markers // *Exp Eye Res*. 2020. Vol. 200. doi: 10.1016/j.exer.2020.108229

Сухоруков А.А. ✉

Основные технологические примеси при производстве препаратов аденоассоциированных вирусных векторов

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ suhorukov.anton991@gmail.com

Аннотация. В работе описаны основные стадии наработки аденоассоциированных вирусов в клеточной линии HEK293 и представлены показатели качества, характерные для генотерапевтических препаратов на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусных векторов для лечения генетически обусловленных заболеваний.

Ключевые слова: аденоассоциированные вирусы; пустые капсиды; агрегаты; HEK293; генная терапия.

Sukhorukov A.A.

The main technological impurities in the production of drug products adenoassociated viral vectors

Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The paper describes the main stages of development of adenoassociated viruses in the HEK293 cell line and presents quality indicators characteristic of gene therapy drug products based on recombinant adenoassociated viral vectors for the treatment of genetically determined diseases.

Keywords: adenoassociated viruses; empty capsids; aggregates; HEK293; gene therapy.

Наиболее распространённым способом наработки рекомбинантных аденоассоциированных вирусов (rAAV) является транзистентная трансфекция клеточной линии HEK293 тремя плазмидами: цис-плазмидой, кодирующей ITR с инвертированными концевыми повторами rAAV вместе с экспрессионной кассетой (pAAV-GOI), транс-плазмидой, кодирующей гены *her* и *cap* rAAV (pRepCap), а также вспомогательной плазмидой (pHelper), кодирующей гены-помощники аденовируса, от которых зависит наработка rAAV в клетках [1]. При этом соотношение плазмидных ДНК, как правило, составляет 2:1:1 для pHelper:pRepCap:pAAV-GOI [1]. Трансфицированным клеткам дают возможность продуцировать вирус в течение нескольких дней, прежде чем клетки, содержащие вирус, будут разрушены путем химического или механического лизиса и обработаны нуклеазой для удаления любой свободной ДНК в культуральной жидкости. Примеси, которые образуются в процессе производства и при этом не являются молекулярными вариантами готового продукта, называют технологическими примесями. Для технологии получения rAAV типичной примесью принято считать остаточную эндонуклеазу и детергент со стадии лизиса клеток. После лизиса и обработки эндонуклеазой в культуральной жидкости остаются компоненты культуры клеток, фрагменты плазмидной ДНК, компоненты питательной среды, пустые и заполненные капсиды. Для очистки вирусных векторов от примесей клеточный лизат передают на стадии выделения и очистки [1].

Поскольку rAAV относительно простой безоболочечный и высокостабильный вирусный вектор, для его очистки можно использовать все стандартные высокопроизводительные методы очистки белков. Нами предложена схема для осуществления очистки rAAV и охарактеризованы основные примеси родственных и технологических примесей с целью дальнейшего получения готовой лекарственной формы.

Тангенциальная фильтрация, ионообменная хроматография, ультрацентрифугирование, а также различные методы аффинной хроматографии подходят для очистки культуральной жидкости от примесей.

В процессе производства rAAV, помимо правильно упакованных целевых капсидов, полупродукты также содержат смесь родственных примесей: пустые капсиды, частично заполненные капсиды с фрагментами ДНК культуры клеток и участками плазмид [2, 3, 4, 5]. Для снижения концентрации пустых капсидов прибегают к хроматографии или методам центрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия или йодиксанола. Капсиды имеют тенденцию к агрегации в зависимости от их общей концентрации и условий окружающей среды, таких как температура, pH, ионная сила, осмоляльность, наличие стабилизаторов [3]. Агрегаты вирусов представляют собой родственные примеси с негативным влиянием на безопасность и долгосрочную стабильность готового продукта, поскольку даже следовые количества агрегированных частиц (<1%) могут являться сайтами образования более крупных агрегатов [3, 4]. Частица rAAV имеет средний диаметр 25 нм, однако в препаратах могут присутствовать как маленькие олигомеры ($d < 100$ нм), так и большие агрегаты ($d > 100$ нм) [3] вследствие высокой концентрации капсидов, остаточных нуклеиновых кислот или низкой ионной силы состава хранения. Таким образом, агрегация может происходить на этапах производства, сопряженных с увеличением концентрации капсидов, остаточной ДНК или изменением ионной силы, например, во время концентрирования раствора или в процессе замены состава хранения [5]. Пустые капсиды, частично заполненные капсиды и агрегаты капсидов очень похожи на целевой продукт и не могут быть легко удалены в процессе очистки. Например, капсид AAV, содержащий предполагаемую терапевтическую экспрессионную кассету, биохимически настолько похож на капсид, который содержит фрагмент ДНК культуры клеток аналогичного размера, что их разделение является сложной технологической задачей [2]. В результате выделения и очистки удаётся свести к минимуму содержание родственных примесей и примесей, пришедших со стадии наработки вирусных частиц в культуре клеток. Однако элюированные фрагменты хроматографических сорбентов и остаточный йодиксанол или хлорид цезия со стадии ультрацентрифугирования являются технологическими примесями на стадии выделения и очистки.

На заключительном этапе для производства готовой лекарственной формы очищенный от родственных и технологических примесей раствор переводили в целевой состав вспомогательных веществ, обеспечивающий стабильность вектора в заявленных условиях, концентрировали до целевой терапевтической концентрации и расфасовывали в первичную упаковку в виде готовой лекарственной формы. Контроль расфасованного препарата осуществляли по показателям качества, предъявляемым к парентеральным лекарственным препаратам в соответствии с ОФС.1.4.1.0007.15 «Лекарственные формы для парентерального применения», а также к генотерапевтическим препаратам в соответствии с ОФС.1.9.1.0001.18 «Генотерапевтические лекарственные препараты».

Список литературы

1. Rooij J. Pros and cons of suspension culture systems in LVV upstream bioprocessing // Cell Gene Therapy Insights. 2019. Vol. 5, Suppl. 5. P. 925–930. doi: 10.18609/cgti.2019.091
2. Wright J.F. Quality control testing, characterization and critical quality attributes of adeno-associated virus vectors used for human gene therapy // Biotechnol J. 2021. Vol. 16, N 1. doi: 10.1002/biot.202000022
3. Gimpel A.L., Katsikis G., Sha S., et al. Analytical methods for process and product characterization of recombinant adeno-associated virus-based gene therapies // Mol Ther Methods Clin Dev. 2021. Vol. 20. P. 740–754. doi: 10.1016/j.omtm.2021.02.010
4. Wright J.F. Product-related impurities in clinical-grade recombinant aav vectors: characterization and risk assessment // Biomedicines. 2014. Vol. 2, N 1. P. 80–97. doi: 10.3390/biomedicines2010080
5. Cashen P., Manser B. Quality by design (QbD) for adeno-associated virus (AAV) a framework for a QbD assessment for AAV products within the chemistry manufacturing and controls (CMC) documentation. Pall corporation, 2021. Дата обращения: 20.10.2024. Режим доступа: <https://www.biosimilardevelopment.com/doc/qualityby-design-qbd-for-adeno-associated-virus-aav-0001>

Сыманович А.А. ✉, Примакова Е.А., Назарова Е.А., Ефимов Д.Ю., Юркина Е.Г., Дедюля Н.И., Садовский Д.Н., Романова И.А., Марчук А.Г., Щерба А.Е., Кривенко С.И., Руммо О.О.

Применение гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток пуповинно-плацентарного комплекса в терапии цирроза трансплантата печени: описание клинического случая

Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

✉ alefityna@tut.by

Аннотация. Цель исследования — оценка безопасности и терапевтической эффективности применения комбинированного биомедицинского клеточного продукта (БМКП) на основе гепатоцитов и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповинно-плацентарного комплекса у пациента с циррозом трансплантата печени.

Ключевые слова: гепатоциты; мезенхимальные стволовые клетки пуповинно-плацентарного комплекса; клеточная терапия.

Symanovich A.A., Primakova E.A., Nazarova E.A., Efimov D.Y., Yurkina E.G., Dedyulya N.I., Sadouski D.N., Romanova I.A., Marchuk A.G., Shcherba A.E., Krivenko S.I., Rummo O.O.

Hepatocyte and placental mesenchymal stem cells for treatment of transplant liver cirrhosis: the results of a pilot clinical case

Minsk scientific and practical center for surgery, transplantology and hematology, Minsk, Belarus

Abstract. The aim of this study was to evaluate the safety and the therapeutic potential of combined biomedical cell product (BMCP) based on hepatocytes and placental mesenchymal stem cells for the treatment of transplant liver cirrhosis.

Keywords: hepatocyte; placental mesenchymal stem cells; cell therapy.

Гепатоциты выделяли из печени умершего донора или из фрагмента печени, полученного при выполнении родственной трансплантации печени, по стандартной методике [1]. МСК получали из хориальной пластинки плаценты здоровой роженицы, подписавшей информированное согласие, которой было проведено родоразрешение методом кесарева сечения. Гепатоциты человека криоконсервировали в жидком азоте в концентрации от 6,25 до $11,6 \times 10^6$ /мл. Для предварительной оценки качества клеточного продукта (оценка апоптоза) размороженные гепатоциты помещали в прибор для прижизненной клеточной визуализации InscuCyte S3 (США). Апоптотические клетки окрашивались при взаимодействии с реагентом «Annexin V Green Reagent for Apoptosis» в зеленый цвет. Апоптотическая активность в культуре гепатоцитов была минимальной и составляла 5–7% от общего количества клеток, иммунофенотипически определялся высокий уровень экспрессии внутриклеточного маркера Cytokeratin (97,3%). Мезенхимальные стволовые клетки из хориальной пластинки характеризовались веретенообразной морфологией и соответствовали морфологическим, а также иммунофенотипическим характеристикам МСК, характеризовались высоким уровнем стромально-ассоциированных маркеров (CD90, CD105, CD13, CD44, CD9) и отсутствием экспрессии CD14, CD45, HLA-DR, CD34. При подготовке комбинированного БМКП учитывали группу крови пациента, контроль стерильности (КС) клеточного продукта проводили на автоматизированном анализаторе

ВасТ/ALERT 3D (Франция) с использованием факультативно-анаэробных сред на основе стриптиказо-соевого бульона. Полученный комбинированный БМКП вводили реципиентке с помощью трансъюгулярного доступа с целью минимизации возможных геморрагических осложнений в количестве 176×10^6 гепатоцитов и $117,5 \times 10^6$ МСК пуповинно-плацентарного комплекса соответственно. Жизнеспособность клеток составила 98% (по исключению трипанового синего). Показанием к введению явился клинический диагноз: состояние после ортотопической трансплантации печени по поводу цирроза печени алиментарно-токсического генеза, цирроз трансплантата печени; печеночно-клеточная недостаточность. После введения комбинированного БМКП отмечалась положительная динамика лабораторных показателей, характеризующих метаболическую и синтетическую функции печени через 7 суток после клеточной инфузии (снижение уровня билирубина с $171,9$ мкмоль/л на 0-е сутки до $34,7$ мкмоль/л на 7-е сутки; увеличение уровня антитромбина III с 41% на 0-е сутки до 111% на 7-е сутки). Пациентка выписана на амбулаторный этап лечения с улучшением общего состояния. При оценке эффективности локального интрапортального введения комбинированного БМКП (гепатоциты + МСК пуповинно-плацентарного комплекса) установлен положительный эффект, клинический и лабораторный, в 2 наблюдениях (рост антитромбина, снижение уровня билирубина) со стабилизацией течения печеночной недостаточности. Все вышеперечисленное позволяет сформировать гипотезу о том, что интрапортальное введение комбинированного БМКП у пациентов с циррозом трансплантата печени улучшает синтетическую и метаболическую функцию печени, тем самым обеспечивая увеличение сроков ожидания экстренной трансплантации печени.

Список литературы

1. Dhawan A., Hughes R.D., editors. Hepatocyte transplantation: methods and protocols. New Jersey: Humana Totowa, 2009. doi: 10.1007/978-1-59745-201-4

Тенчурин Т.Х. ✉, Шепелев А.Д., Мамагулашвили В.Г., Сытина Е.В., Соловьева Е.В., Сидорук К.В., Малахов С.Н., Несмелов А.А., Шариков Р.В., Пантелеев А.А., Чвалун С.Н.

Трехмерные клеточные каркасы на основе фиброина шелка и коллагена для регенеративной медицины

НИЦ «Курчатовский Институт», Москва, Россия

✉ tenchurin.timur@mail.ru

Аннотация. Методом электроформования на основе коллагена и фиброина получены волокнистые материалы с прочностью от 0,5 до 0,9 МПа, деформацией при разрыве от 54 до 83% и средним размером пор от 5 до 16 мкм. Биосовместимость изготовленных материалов была оценена *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: коллаген; фиброин; электроформование; нановолокна; поры; фибробласты; васкуляризация.

Tenchurin T.Kh., Shepelev A.D., Mamagulashvili V.G., Sytina E.V., Solovyeva E.V., Sidoruk K.V., Malakhov S.N., Nesmelov A.A., Sharikov R.V., Panteleyev A.A., Chvalun S.N.

3D cell scaffolds based on silk fibroin and collagen for regenerative medicine

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. Fibrous materials with strength from 0.5 to 0.9 MPa, with a strain at break from 54 to 83% and an average pore size from 5 to 16 μm were obtained by electrospinning on the basis of collagen and fibroin. The biocompatibility of the fabricated materials was evaluated *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: collagen; fibroin; electrospinning; nanofibres; pores; fibroblasts; vascularisation.

Разработка биоискусственных клеточных систем, в частности кожи, подразумевает создание клеточных носителей/каркасов на основе синтетических и/или природных полимеров [1, 2]. Тканевая инженерия — интенсивно развивающаяся высокотехнологичная область и многие инновационные компании борются за долю этого растущего рынка. По прогнозам специалистов, размер мирового рынка тканевой инженерии в 2032 г. возрастет в три раза по сравнению с 2023 г. и будет исчисляться 33.38 миллиардов долларов [3]. Несмотря на высокую востребованность в клинике, прогресс в этой области требует решения целого ряда проблем, как в области технологий, так и в сфере нашего понимания физиологии клеток и тканей.

Лиофилизированный коллаген (К) и фиброин (Ф) растворяли в 1,1,1,3,3,3- гексафторизопропанол (ГФИП) в заданном соотношении (0/100; 30/70, 50/50, 70/30, 100/0). Волокнистые материалы получали методом электроформования из совместных растворов коллагена и фиброина в ГФИП концентрацией 7%. Для увеличения размера пор в нановолокнистых материалах использовали соль NH_4HCO_3 с размером частиц 200–250 мкм. Для удаления соли и остатков растворителя все полученные материалы помещались в вакуумный шкаф при давлении 10^{-3} мм рт. ст. и температуре 110 °С. Анализ распределения волокон по ширине показал, что все изготовленные материалы в основном состоят из волокон диаметром ≥ 2 мкм. Волокнистые материалы, полученные без добавления соли, обладают средним размером пор менее 5 мкм, что является недостаточным для проникновения клеток. Добавление частиц соли (200–250 мкм) приводит к появлению пор диаметром до 16–18 мкм, позволяющим клеткам проходить через волокнистую сетку. Введение соли также увеличивало пористость изготовленных материалов. Для оценки возможной деградации образцы из коллагена и фиброина растворили в ГФИП и подвергли электрофоретическому анализу. Полученные результаты указывают на отсутствие деградации: электрофоретические профили нетканого материала из коллагена,

фиброина и их смеси не имеют выраженных полос в области молекулярных масс ниже 75 кДа. Для сохранения волокнистой структуры и улучшения механических свойств полученных материалов проводили их сшивание генипином. Степень сшивки изготовленных материалов находилась от 30 до 60%. Механические свойства изготовленных материалов соответствовали прочности при растяжении тканей ротовой полости и пищевода человека. Все изготовленные нетканые материалы характеризовались отсутствием токсичности и высокой биосовместимостью с фибробластами кожи человека. Образцы волокнистых материалов имплантировали подкожно мышам линии C57Bl на 14, 21 или 28 дней (образцы К/Ф 50/50 + соль время сшивания 1–5 дней). Формирование новых капилляров (васкуляризация) для материалов, полученных при солевом формовании, было отмечено уже на 14-й день после имплантации. На 21-й день образцы с порами были окружены тонкой капсулой, количество лейкоцитов, инфильтрировавших ткань, заметно снизилось, в капсуле и в самом материале были хорошо различимы капилляры. При этом сам материал на этом сроке сохранялся в тканях и был хорошо различим на срезах.

К 28-му дню гистологическая картина осталась практически такой же, как на 21-й день, только несколько снизилось количество лейкоцитов в инфильтрате. Контрольный образец материала, выполненного без соли (К/Ф 50/50 время сшивания 5 дней), из-за отсутствия необходимых для проникновения клеток пор, не подвергался васкуляризации на всем протяжении исследования (14, 21, 28 дней подкожной имплантации). Таким образом, предложенный способ изготовления клеточных каркасов для различных задач тканевой инженерии достаточно перспективен.

Благодарности

Работа проведена в рамках соглашения с Министерством науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2023-324, договор 74/21-СИН1357.

Список литературы

1. Zhao C., Xiao Y., Ling S., et al. Structure of collagen // *Methods Mol Biol.* 2021. Vol. 2347. P. 17–25. doi: 10.1007/978-1-0716-1574-4_2
2. Wu H., Lin K., Zhao C., et al. Silk fibroin scaffolds: a promising candidate for bone regeneration // *Front Bioeng Biotechnol.* 2022. Vol. 10. doi: 10.3389/fbioe.2022.1054379
3. Tissue engineering market size. Share and trends 2024 to 2023. В: *Precedence research* [Internet]. Режим доступа: <https://www.precedenceresearch.com/tissue-engineering-market> Дата обращения: 20.10.2024.

Тимофеева А.В. ✉, Ахметзянова Э.Р.

Исследование микроглиальной активации инфламмосомы NLRP3 при травме спинного мозга *in vivo*

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ anua_tima@mail.ru

Аннотация. Травма спинного мозга (ТСМ) вызывает нарушения моторных и сенсорных функций. Клетки микроглии активируются в ответ на повреждение, модулируя воспаление через инфламмосому NLRP3. В исследовании показано, что при тяжелой ТСМ количество активированной микроглии возрастает, но уровень IL-18 остаётся стабильным.

Ключевые слова: микроглия; инфламмосома; травма спинного мозга; крысы.

Timofeeva A.V., Akhmetzyanova E.R.

Study of microglial NLRP3 inflammasomes activation in spinal cord injury *in vivo*

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Spinal cord injury (SCI) leads to motor and sensory dysfunction. Microglia activate in response to damage, modulating inflammation through the NLRP3 inflammasome. The study demonstrates that in severe SCI, the number of activated microglia increases, but the IL-18 level remains stable.

Keywords: microglia; inflammasome; spinal cord injury; rats.

Травма спинного мозга (ТСМ) является серьезным неврологическим состоянием, приводящим к значительным нарушениям моторных и сенсорных функций, а также к хроническим болевым синдромам. Клетки микроглии являются резидентными иммунными клетками центральной нервной системы и быстро реагируют на повреждение ткани путем активации и изменения своей функциональной поляризации. В зависимости от микросреды и сигналов, поступающих от поврежденных нейронов и других клеток, микроглия может принимать различные фенотипы, выполняя как нейропротекторные, так и нейротоксические функции. Эта пластичность микроглии делает ее ключевым элементом в патофизиологии ТСМ. Одним из важных механизмов, посредством которых микроглия модулирует воспалительный ответ, является активация инфламмосомы NLRP3, представляющей собой мультибелковый комплекс, который ведет к высвобождению провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-18 (IL-18). Изучение роли микроглии и инфламмосомы NLRP3 при ТСМ имеет важное значение, поскольку понимание этих процессов может привести к разработке новых терапевтических стратегий, направленных на ограничение воспаления и улучшение восстановления после ТСМ. В данной работе была проведена количественная оценка популяции клеток микроглии с активацией инфламмосом NLRP3, а также содержания провоспалительного цитокина IL-18 в хронический период ТСМ в области, приближенной к эпицентру повреждения (Th9). При помощи Leica Impact One Stereotaxic была смоделирована ТСМ крысы легкой (ТСМ1,5) и тяжелой (ТСМ4) степени тяжести на уровне позвонка Th8. Количественную оценку клеток микроглии на фоне повреждения проводили путем иммуногистохимического анализа с использованием антител к Iba1(+)/NLRP3(+) в зонах передних рогов (VH) и кортикоспинального тракта (CST). Количество Iba1⁺/NLRP3⁺-клеток в зоне VH было выше при травме тяжелой степени тяжести при сравнении с аналогичным показателем в группе с легким течением повреждения. В области CST достоверных различий при подсчете Iba1⁺/NLRP3⁺-клеток обнаружено не было. Таким образом, наибольшие

изменения в количественной оценке клеток микроглии с активацией инфламмосомы NLRP3 были обнаружены при моделировании ТСМ тяжелой степени тяжести. Данные мультиплексного иммуноанализа показали, что содержание цитокина IL-18 как в группе ТСМ1,5, так и в группе ТСМ4 не претерпевает значительных изменений, что может быть связано с персистирующим воспалением в области Th9 в хронический период ТСМ.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00348.

Тимченко Р.М. ✉, Пантелеев М.А.

Математическая модель внутреннего пути апоптоза фибробластов

Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии РАН, Москва, Россия

✉ ruslan.m.timchenko@gmail.com

Аннотация. Была разработана модель внутреннего пути апоптоза на основе обыкновенных дифференциальных уравнений. В основе модели лежат взаимодействия белков Bcl-2 между собой. Было показано, что модель обладает переключательными свойствами.

Ключевые слова: апоптоз; семейство Bcl-2; математическая модель; переключательная система.

Timchenko R.M., Panteleev M.A.

Mathematical model of the intrinsic pathway of fibroblast apoptosis

Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. A model of the intrinsic apoptotic pathway was developed based on ordinary differential equations. The model is based on the interactions of Bcl-2 proteins with each other. It was shown that the model has switching properties.

Keywords: apoptosis; Bcl-2 family; mathematical model; switch system.

Механизмы апоптоза играют фундаментальную роль в регуляции развития, гомеостаза и регенерации тканей человека: например, апоптоз фибробластов важен при поздних этапах заживления ран. Однако на данный момент времени отсутствуют предсказательные модели ранних этапов внутреннего пути апоптоза, на основе которых можно было бы предположить, в каких условиях, формирующимися внешними и внутренними факторами, клетка выживает, а в каких гибнет. Нами была разработана математическая модель первых реакций внутреннего пути апоптоза фибробластов на основе обыкновенных дифференциальных уравнений, полученных из законов химической кинетики. Модель описывает процессы, происходящие до активации каспаз, а именно сборку пор на внешней мембране митохондрии с целью выпуска наружу цитохрома c. Этот процесс подчиняется закону «всё или ничего»: цитохром c будет либо весь выпущен из митохондрии, либо весь останется в ней, что характерно для переключательных систем. Модель основана на взаимодействии белков семейства Bcl-2, контролирующего этот процесс порообразования. Учитываются процессы транслокации белков в митохондрии и цитозоль, активация белков семейства Bcl-2 на внешней митохондриальной мембране, образование гомодимеров Bax и гетеродимеров Bax-Bcl2. Показано, что модель обладает переключательными свойствами: при небольших изменениях концентраций белков решение теряет устойчивость, что означает интенсивное порообразование на внешней мембране митохондрий.

Тихонова Н.Б.¹✉, Темнов А.А.², Алексанкина В.В.¹, Алексанкин А.П.¹, Фокина Т.В.¹,
Склифас А.Н.², Милованов А.П.¹

Особенности заживления матки крысы под воздействием умеренно гипоксической кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток

¹ НИИМЧ им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ «РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ФГБНУ ФИЦ ПНЦБИ РАН обособленное подразделение ИБК РАН, Пущино, Россия

✉ nb-ti@hotmail.com

Аннотация. Кондиционированной средой стромальных клеток костного мозга (КМСК), выращенных при 10% O₂, обрабатывали разрез матки крыс однократно перед ушиванием. На 5-е и 15-е сутки исследовали CD34, CD68, FABP4, MMP9, TIMP1, FGF2, CoL1a1, CoL4, IL-1b, IL-4, IL-6 и IL10. Применение КМСК привело к сокращению зоны повреждения и ускорению восстановления.

Ключевые слова: кондиционированная среда; стромальные клетки костного мозга; CD34; CD68; FABP4; интерлейкины; внеклеточный матрикс; матка крысы; заживление.

Tikhonova N.B.¹, Temnov A.A.², Aleksankina V.V.¹, Aleksankin A.P.¹, Fokina T.V.¹, Sklifas A.N.², Milovanov A.P.¹

Features of healing of rat uterus under the influence of moderated hypoxic conditioned medium of mesenchymal stromal cells

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

² Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino Moscow region, Russia

Abstract. The incision of the rat uterus was treated before suturing by conditioned medium of bone marrow stromal cells (CMSC) cultured at 10% O₂. At 5 and 15 days, CD34, CD68, FABP4, MMP9, TIMP1, FGF2, CoL1a1, CoL4, IL-1b, IL-4, IL-6 and IL10 were examined. The use of CMSC has resulted in a reduction of the damage area and an acceleration of repair.

Keywords: conditioned media; stromal cells of bone marrow; CD34; CD68; FABP4; interleukins; extracellular matrix; rat uterus; healing.

Введение. Количественные и качественные показатели секрета культивируемых мезенхимальных стромальных клеток (МСК) зависят от условий культивирования. В предыдущих исследованиях было показано, что умеренно гипоксическая кондиционированная среда способствовала ингибированию воспалительных реакций в поврежденной печени [1] и снижению патологического ангиогенеза в роговице глаза [2]. Однако её влияние на заживление маточной стенки после сквозного хирургического разреза было установлено впервые.

Цель — установить влияние кондиционированной среды культивируемых стромальных клеток костного мозга (КМСК), выращенных при 10% O₂, на заживление матки крысы линии Sprague-Dawley (SD).

Методы. Стромальные клетки были извлечены из костного мозга бедренной кости крыс SD. Клетки культивировали до получения монослоя. Клеточный монослой культивировали в условиях умеренной гипоксии (10% O₂, 5% CO₂) в течение 3 суток. Для получения препарата кондиционированной среды собирали культуральную среду и объединяли с растворимой фракцией клеточного лизата [1]. В эксперимент включали самок со стабильным эстральным циклом продолжительностью 5 суток, сквозной разрез правого маточного рога проводили всегда в фазу эструса, левый рог оставляли интактным в качестве внутреннего

контроля. Разрез маточной стенки экспериментальной группы обрабатывали кондиционированной средой до ушивания, в контрольной группе разрез ушивали без обработки. На 5-й и 15-й день после операции проводили гистологическое исследование с окрашиванием по Маллори и гематоксилином и эозином, иммуногистохимическое выявление α SMA, CD34, CD68, FABP4 в зоне заживления, а также определяли уровень экспрессии мРНК для MMP9, TIMP1, FGF2, CoL1a1, CoL4, IL-1b, IL-4, IL-6 и IL10 в ПЦР-РТ. Статистический анализ результатов проводили в программе Prism (Ver.8.0, GraphPad). Значимость различий определяли по критерию Краскела–Уоллиса с попарным сравнением по критерию Данна.

Результаты. Площадь зоны заживления обработанной группы была ниже по сравнению с контрольной во все сроки мониторинга ($p < 0.05$). На 5-е сутки экспрессия CoL1a1, IL-4 и IL-10, содержание CD34 клеток и площадь новообразованной ткани оказались ниже в экспериментальной группе. На 15-е сутки экспрессия MMP9, TIMP1, FGF2, CoL1a1, IL-1b была ниже, а содержание CD34, CD68 и FABP4 клеток и площадь зоны заживления выше в контрольной группе. С 5-х по 15-е сутки в контрольной группе произошло снижение экспрессии мРНК MMP9, TIMP1, CoL1a1, CoL4, IL-1b, IL-4, IL-6 и IL10. В экспериментальной группе снизилось количество клеток CD68 в зоне заживления и FABP4 в зоне периметрия. В контрольной группе в зоне периметрия произошло увеличение скоплений FABP4 клеток. В зоне поврежденного миометрия скопления клеток FABP4, наблюдавшиеся на 5-е сутки в обеих группах, отсутствовали в экспериментальной группе в 100% случаев, а в контрольной группе отмечены только в 30% наблюдений. Количество CD34 клеток повысились к 15-м суткам в обеих группах, но и на 5-е, и на 15-е сутки в экспериментальной группе их было меньше, чем в контрольной. В то же время количество сосудов, окрашенных α SMA, в экспериментальной группе снизилось к 15-м суткам, а в контрольной не изменилось. Количество сосудов в оба срока наблюдения в экспериментальной группе было ниже ($p < 0,05$), что согласуется с показателями CD34.

Заключение. Компоненты умеренно гипоксической кондиционированной среды мезенхимальных стромальных клеток костномозгового происхождения ускоряют заживление сквозного разреза маточной стенки, снижают воспалительную реакцию и способствуют полному завершению воспалительной фазы уже к 5-м суткам, физиологические уровни интерлейкинов восстанавливаются в поврежденном роге к 15-м суткам после операции. Исчезновение клеток FABP4 в области поврежденного миометрия и снижение в периметрии в зоне взаимодействия с жировой тканью также указывает на завершение процесса регенерации и, возможно, начало процесса освобождения от жировой ткани. Снижение соединительнотканного компонента между разобщенными слоями миометрия и синхронизация экспрессии генов внеклеточного матрикса зоны заживления с неповрежденной маточной стенкой к 15-м суткам после операции также свидетельствует о положительном эффекте применения такого препарата.

Список литературы

1. Temnov A.A., Rogov K.A., Sklifas A.N., et al. Protective properties of the cultured stem cell proteome studied in an animal model of acetaminophen-induced acute liver failure // Mol Biol Rep. 2019. Vol. 46, N 3. P. 3101–3112. doi: 10.1007/s11033-019-04765-z
2. Kodunov A., Temnov A., Tereshchenko A., et al. Mechanisms of the influence of conditioned medium of cultured stem cells on the development of pathological angiogenesis in the eye cornea in experiment // Patogenez (Pathogenesis). 2022. Vol. 19, N 4. P. 41–52. doi: 10.25557/2310-0435.2021.04.41-52

Тихонова Н.Б.¹, Степанова И.И.¹, Гусарова Т.А.², Степанов А.А.¹, Михалева Л.М.¹, Низяева Н.В.¹ ✉

Значение внеклеточных нейтрофильных ловушек при репродуктивных потерях

¹ НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», Москва, Россия

² ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница им. В.В. Виноградова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

✉ nizyaeva@gmail.com

Аннотация. Протеиназа 3 (PR3), миелопероксидаза (МПО) и комплекс PR3/МПО в системной циркуляции. PR3, МПО и их комплекс в сыворотке крови могут служить потенциальными маркерами замершей беременности и указывать на активацию нейтрофилов. PR3 увеличивается сильнее. Значительное увеличение циркулирующего комплекса PR3/МПО указывает на возможную роль в патогенезе замершей беременности.

Ключевые слова: внеклеточные нейтрофильные ловушки; невынашивание беременности; миелопероксидаза; протеиназа 3.

Tikhonova N.B.¹, Stepanova I.I.¹, Gusarova T.A.², Stepanov A.A.¹, Mikhaleva L.M.¹, Nizyaeva N.V.¹

Significance of extracellular neutrophil traps in reproductive losses

¹ Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Center of Surgery, Moscow, Russia

² Vinogradov Clinical Hospital of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia

Abstract. Proteinase 3, Myeloperoxidase and their complex in blood serum can serve as potential markers of missed abortion and indicate neutrophil activation. PR3 increases more. A significant increase in the circulating PR3/MPO complex indicates a possible role in the pathogenesis of missed abortion.

Keywords: extracellular neutrophil traps; miscarriage; myeloperoxidase; proteinase 3.

Введение. Замершая беременность в 1-м триместре является частым осложнением беременности. Для выявления риска выкидыша и улучшения исходов беременности необходимы высокоинформативные маркеры. Было показано, что высокое соотношение нейтрофилов/лимфоцитов может указывать на риск потери плода [1–3]. Роль активированных нейтрофилов в патогенезе ранних потерь неизвестна. Уровни нейтрофильной протеиназы 3 (PR3), миелопероксидазы (МПО) и их комплекса (PR3/МПО) в сыворотке крови являются индикаторами активации нейтрофилов. Содержание PR3/МПО-комплекса в крови может служить количественной характеристикой нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВО).

Цель исследования — оценить связь замершей беременности в первом триместре беременности с уровнями PR3, МПО и комплекса PR3/МПО в системной циркуляции.

Методы. В исследование были включены 80 последовательно согласившихся беременных женщин (18–40 лет, срок беременности 5–13 недель): у 60 пациенток была замершая беременность, у 20 женщин беременность протекала неосложненно. Для обеих групп были собраны общие клинические данные, общий анализ крови. Измеряли протромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, тромбиновое время, фибриноген, плазминоген и активность альфа-антиплазмина. Уровни PR3, МПО, PR3/МПО-комплекса в сыворотке крови определяли методом ИФА. Статистический анализ проводили с использованием ранговых корреляций Спирмена(r), ROC-анализа, критерия Манна–Уитни с критическим значением $p < 0,05$. Данные представлены в виде медианы с межквартильным размахом (Me;Q1–Q3).

Результаты. Пациентки с замершей беременностью имели более высокие показатели PR3 (343 нг/мл; 109–455) ($p < 0,0001$), МПО (707 нг/мл; 465–869) ($p < 0,0001$) и PR3/МПО-комплекса (10 ед/мл; 5,9–15) ($p < 0,0001$), чем у здоровых женщин PR3 (21 нг/мл; 18–22), МПО (217 нг/мл; 146–236) и PR3/МПО-комплекс (5,0 ед/мл; 4,0–5,4). Выявлена сильная положительная корреляция в обеих группах между PR3 и МПО (здоровые: $r = 0,717$; аборт: $r = 0,796$), и только для абортов между PR3/МПО-комплексом и PR3 ($r = 0,546$) МПО ($r = 0,396$). В группе с замершей беременностью наблюдалась отрицательная корреляция между МПО и активностью а2-антиплазмина ($r = -0,503$), а МПО имела положительную корреляцию с лейкоцитами ($r = 0,410$) и нейтрофилами ($r = 0,424$). PR3 коррелировал с лейкоцитами ($r = 0,395$), нейтрофилами ($r = 0,499$) и соотношением нейтрофилов/лимфоцитов ($r = 0,400$). PR3/МПО-комплекс показал умеренную корреляцию только с тромбоцитами ($r = 0,430$). ROC-анализ применялся для оценки чувствительности (SN) и специфичности (SP) PR3 (SN = 97%; SP = 100%, AUC = 0,995), МПО (SN = 87%; SP = 95%, AUC = 0,941) и комплекс PR3/МПО (SN = 77%; SP = 95%, AUC = 0,888), чтобы отличить женщин с замершей беременностью от здоровых беременных.

Заключение. PR3, МПО и их комплекс в сыворотке крови могут служить потенциальными маркерами замершей беременности и указывать на активацию нейтрофилов. PR3 увеличивается сильнее. Значительное увеличение циркулирующего комплекса PR3/МПО указывает на возможную роль внеклеточных нейтрофильных ловушек в патогенезе замершей беременности.

Список литературы

1. Guillotin F., Fortier M., Portes M., et al. Vital NETosis vs. suicidal NETosis during normal pregnancy and preeclampsia // *Front Cell Dev Biol.* 2023. Vol. 10. doi: 10.3389/fcell.2022.1099038
2. Bouvier S., Fortier M., Vincent L., et al. NETosis markers in pregnancy: effects differ according to histone subtypes // *Thromb Haemost.* 2021. Vol. 121, N 7. P. 877–890. doi: 10.1055/s-0040-1722225
3. Aslanian-Kalkhoran L., Mehdizadeh A., Aghebati-Maleki L., et al. The role of neutrophils and neutrophil extracellular traps (NETs) in stages, outcomes and pregnancy complications // *J Reprod Immunol.* 2024. Vol. 163. doi: 10.1016/j.jri.2024.104237

Ткачев С.Ю. ✉, Чепелова Н.К., Галечян Г.Ю., Ершов Б.П., Голуб Д.А., Попова Е.О., Антошин А.А., Гилязова А.Н., Волошин С.Ю., Ефремов Ю.М., Истранова Е.В., Тимашев П.С.

Новый подход к визуализации клеточных культур в коллагеновых скаффолдах в водной среде с помощью рентгеновской микротомографии

Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ tkachev_s_yu@staff.sechenov.ru

Аннотация. Разработан протокол для анализа нативной структуры коллагеновых скаффолдов в 3% водном растворе фосфорновольфрамовой кислоты методом рентгеновской микротомографии. Различия в значениях интенсивности между волокнами, порами и массами клеток позволяют провести точную сегментацию для анализа образцов.

Ключевые слова: тканевая инженерия; компьютерная микротомография; конфокальная микроскопия; биоинспирированные материалы; коллагеновые скаффолды; модели *in vitro*; регенеративная медицина.

Tkachev S., Chepelova N., Galechyan G., Ershov B., Golub D., Popova E., Antoshin A., Giliyazova A., Voloshin S., Efremov Yu., Istranova E., Timashev P.

A New Frontier in Cell Culture Micro-CT Visualization within Collagen Scaffolds in an aqueous environment

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. A protocol for analyzing the native structure of collagen scaffolds in 3% aqueous phosphorus-tungstic acid solution by X-ray microtomography has been developed. Differences in intensity values between fibers, pores, and cell masses allow accurate segmentation for sample analysis.

Keywords: tissue engineering; computed microtomography; confocal microscopy; bioinspired materials; collagen scaffolds; *in vitro* models; regenerative medicine.

Коллаген — ключевой структурный белок, широко представленный в различных тканях организма. Благодаря своей биосовместимости и биоразлагаемости, коллагеновые скаффолды стали основой для создания различных биоинженерных конструкций, используемых для замещения поврежденных или утраченных тканей [1, 2]. Однако успешное применение коллагеновых скаффолдов в клинической практике требует глубокого понимания их внутренней структуры и того, как клетки распределяются в трехмерной среде.

Одной из главных задач тканевой инженерии является разработка методов визуализации, которые позволяют изучать сложную архитектуру клеточных скаффолдов без разрушения образцов. Так, традиционное гистологическое исследование не может дать представления о пространственной организации скаффолда, поскольку приводит к нарушению целостности образцов и их деформации, что затрудняет анализ распределения клеток и оценку пористости скаффолдов.

В данной работе предложен инновационный подход к визуализации коллагеновых скаффолдов, засеянных клетками, с помощью рентгеновской микрокомпьютерной томографии (микро-КТ) в сочетании с контрастированием 3% водным раствором фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). Этот метод позволяет визуализировать клетки, поры и коллагеновые волокна в условиях, максимально приближенных к физиологическим, предотвращая разрушение и деформацию образцов [3, 4]. Коллагеновые скаффолды, заселенные

клеточной линией NIH/3T3, были контрастированы различными агентами, такими как ФВК, ацетат свинца и лантаноиды, что позволило провести детальный сравнительный анализ их эффективности.

Результаты показали, что использование 3% раствора ФВК обеспечивает наилучшее качество визуализации, позволяя четко различать коллагеновые волокна, поры и клеточные массы. Это было достигнуто благодаря высокой способности ФВК селективно связываться с коллагеном и позитивно заряженными белками, что обеспечило отличное соотношение сигнал/шум и, как следствие, высокую точность сегментации [5]. Важным достижением является сохранение нативной архитектуры скаффолдов в водной среде, что позволяет получить объективное представление о пространственном распределении клеток и пор в скаффолде.

Сегментация и последующий анализ показали, что клеточные массы значительно деформируют окружающие коллагеновые волокна по мере роста, что открывает новые возможности для изучения механизмов клеточной миграции и взаимодействия клеток с внеклеточным матриксом. Эти данные особенно важны для разработки биоинженерных конструкций, способных эффективно связываться с окружающими тканями организма. В ходе исследования также был продемонстрирован ряд техник, позволяющих минимизировать артефакты и ложноположительные результаты, возникающие из-за высокой плотности коллагеновых волокон, что повышает точность анализа.

Кроме того, разработанный метод позволяет не только визуализировать внутреннюю структуру коллагеновых скаффолдов, но и количественно оценивать такие параметры, как пористость, связность пор и объем клеточных масс. Это открывает широкие перспективы для использования метода в различных областях клеточной биологии и регенеративной медицины, где требуется детальное изучение трехмерных клеточных культур и их взаимодействия с биоматериалами.

Будущие исследования могут быть направлены на создание более сложных протоколов с применением нескольких контрастирующих агентов, которые позволят одновременно визуализировать различные типы клеток и их взаимодействие с коллагеновыми волокнами. Возможным направлением также является разработка новых контрастирующих агентов, которые позволят четко различать живые и мертвые клетки, что дополнительно повысит информативность метода.

Таким образом, представленный протокол исследования коллагеновых скаффолдов методом рентгеновской микротомографии с контрастированием водным раствором ФВК открывает новые горизонты для исследований в области тканевой инженерии и регенеративной медицины, предлагая простой, но мощный инструмент для изучения пространственного распределения клеток в трехмерных скаффолдах. Данный метод может стать важным дополнением к существующим методам визуализации, таким как конфокальная микроскопия, и послужить основой для разработки новых подходов к исследованию клеточных культур и биоматериалов в условиях, приближенных к физиологическим.

Исследования поддержаны Российским научным фондом. Часть работы, связанная с созданием коллагеновых скаффолдов и экспериментами с клетками, была поддержана грантом № 23-15-00481. Часть работы, связанная с визуализацией и дальнейшим анализом коллагеновых скаффолдов с помощью микротомографии, выполнена при поддержке гранта № 22-75-10100.

Список литературы

1. Zhao C., Xiao Y., Ling S., et al. Structure of collagen // *Methods Mol Biol.* 2021. Vol. 2347. P. 17–25. doi: 10.1007/978-1-0716-1574-4_2
2. Patil V.A., Masters K.S. Engineered collagen matrices // *Bioengineering (Basel).* 2020. Vol. 7, N 4. P. 163. doi: 10.3390/bioengineering7040163.
3. Olăret E., Stancu I.C., Iovu H., et al. Computed tomography as a characterization tool for engineered scaffolds with biomedical applications // *Materials* 2021. Vol. 14, N 22. P. 6763. doi: 10.3390/ma14226763
4. Kwon K.A., Bax D.V., Shepherd J.H., et al. Avoiding artefacts in microCT imaging of collagen scaffolds: effect of phosphotungstic acid (PTA)-staining and crosslink density // *Bioactive Materials* 2022. Vol. 8. P. 210–219. doi: 10.1016/j.bioactmat.2021.06.012
5. Hanly A., Johnston R.D., Lemass C., et al. Phosphotungstic acid (PTA) preferentially binds to collagen-rich regions of porcine carotid arteries and human atherosclerotic plaques observed using contrast enhanced micro-computed tomography (CE- μ CT) // *Front Physiol.* 2023. Vol. 14. doi: 10.3389/fphys.2023.1057394

Товпеко Д.В. ✉, Кондратенко А.А., Калюжная Л.И.

Оценка структурных и функциональных свойств децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека как перспективного материала для регенеративной медицины

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ tovpeko.dmitry@gmail.com

Аннотация. Исследованы структурные и функциональные свойства децеллюляризованного вартонова студня пуповины человека. Проведена оценка компонентного состава, процесса деградации, биосовместимости и безопасности образцов. Результаты подтверждают потенциал материала для применения в регенеративной медицине.

Ключевые слова: биосовместимость; вартонов студень пуповины человека; децеллюляризация; МТТ-тест; регенеративная медицина; тканевая инженерия.

Tovpeko D.V., Kondratenko A.A., Kalyuzhnaya L.I.

Evaluation of structural and functional properties of decellularized human umbilical cord-derived Wharton's jelly as a promising material for regenerative medicine

S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Structural and functional properties of decellularized human umbilical cord-derived Wharton's jelly were studied. The component composition, degradation, biocompatibility and safety of the samples were assessed. The results confirm the potential of the material for use in regenerative medicine.

Keywords: biocompatibility; human umbilical cord-derived Wharton's jelly; decellularization; MTT assay; regenerative medicine; tissue engineering.

Повреждения кожи травматического, термического или иного генеза представляют собой широко распространенную патологию как в условиях мирного, так и военного времени. Эти повреждения требуют своевременного и эффективного лечения. Однако использование традиционных общепринятых тактик лечения не всегда приводит к желаемым результатам. Методы тканевой инженерии и регенеративной медицины направлены на создание тканеинженерных конструкций, предназначенных для замещения дефектов ткани и/или стимулирования ее регенерации. Продолжается активный поиск высокофункциональных, биосовместимых и биоразлагаемых материалов, являющихся основой для создания таких конструкций. Значительный интерес представляют биоматериалы, получаемые из тканей человека и животных путем децеллюляризации с сохранением структуры и архитектоники естественного внеклеточного матрикса. Вартонов студень пуповины человека (WJ) — твердая слизистая соединительная ткань внеэмбрионального происхождения, сохраняющая особенности эмбрионального фенотипа, которые проявляются в быстрой регенерации поврежденной ткани и безрубцовом заживлении ран плода. Цель исследования — оценить структурные и функциональные свойства децеллюляризованных образцов ткани WJ (dWJ).

Децеллюляризацию WJ проводили раствором додецилсульфата натрия (SDS) с концентрацией 0,01% с последующим воздействием солянокислым пепсином для получения гидролизата по разработанному

ранее авторскому протоколу [1]. Полученные образцы dWJ лиофилизировали и стерилизовали. Эффективность удаления клеток оценивали с помощью флуоресцентного окрашивания DAPI, гистологического окрашивания гематоксилином и эозином (H&E) и количественного определения ДНК. Оценку компонентного состава образцов ткани WJ и dWJ, а также остаточного содержания в них SDS после децеллюляризации осуществляли с помощью масс-спектропии. Количественное определение содержания общего коллагена и гликозаминогликанов (GAG) проводили спектрофотометрически. Исследование деградации dWJ проводили согласно ГОСТ ISO 10993-13-2016 при 37 ± 1 °C. В качестве модельной среды использовали раствор, имитирующий жидкость организма (SBF). Для оценки метаболической активности фибробластов дермы (ФД) и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК) человека при воздействии на них экстрактов dWJ использовали МТТ-тест согласно ГОСТ ISO 10993-5-2023. Для изучения прикрепления клеток к dWJ к образцам вносили по $2,5\times 10^5$ МСК человека и культивировали в течение 7 суток с последующим окрашиванием митохондриально-селективными красителями MitoTracker Green FM и Orange. Биологическую безопасность dWJ оценивали с использованием модели подкожной имплантации на мышах ($n = 7$) согласно ГОСТ ISO 10993-6-2021. Гистологические срезы тканей области имплантации окрашивали H&E и трихромом Массона.

При исследовании окрашенных DAPI препаратов выявили отсутствие ядер клеток в dWJ. Среднее содержание ДНК в WJ составило 507,1 (473,2–539,2) нг/мг сухого веса, в dWJ — 37,8 (35,6–39,8) нг/мг. Остаточное содержание SDS в dWJ — 26,25 (18,23–32,35) пг/мг сухого веса. Масс-спектрометрический анализ dWJ выявил присутствие коллагенов I, III, IV, V, VI и XII типов, декорина, люмикана, бигликана, фибронектина и других важных для заживления ран белков и пептидов. Среднее содержание общего коллагена в dWJ составило 532,53 (429,10–572,14) мкг/мг, сульфатированных и несulfатированных GAG — 7,32 (4,80–8,85) и 19,22 (15,13–21,84) мкг/мг соответственно. При оценке процесса деградации отмечено уменьшение массы dWJ на 48,78 (48,15–51,10)% за 14 дней. МТТ-тест позволил выявить отсутствие цитотоксичности и дозозависимый характер действия dWJ с увеличением метаболической активности ФД и МСК человека при увеличении концентрации dWJ в экстрактах. По результатам визуализации взаимодействия dWJ и клеток выявлено их прикрепление как на поверхности, так и внутри dWJ. Подкожная имплантация образцов dWJ не выявила признаков отторжения и усиления воспаления. В ходе ограниченных клинических испытаний подтверждены эффективность и безопасность dWJ при совместном использовании с расщепленным аутоотрансплантатом кожи у пациентов с обширными и глубокими ранами [1].

Таким образом, dWJ может быть использован для дальнейшей разработки лекарственных препаратов и медицинских изделий для нужд регенеративной медицины, в частности, предназначенных для лечения пациентов с обширными и глубокими повреждениями кожи и мягких тканей.

Список литературы

1. Патент РФ № 2816034 / 25.03.2024. Хоминец В.В., Калюжная-Земляная Л.И., Кондратенко А.А., и др. Способ применения бесклеточного лиофилизированного продукта из пуповины человека для заживления ран. EDN: HFADTH

Толстолужинская А.Е. ✉, Карагяур М.Н., Басалова Н.А., Дьячкова У.Д., Виговский М.А., Ефименко А.Ю.

Получение линий фибробластов человека с модулируемой экспрессией гена белка активации фибробластов α (FAP α)

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ a.luzh@yandex.ru

Аннотация. Фиброгенез тканей сопровождается ростом числа активированных стромальных клеток, секретирующих белок активации фибробластов α , роль которого в данных процессах до конца не ясна. В данной работе были получены линии фибробластов человека с нокаутом и оверэкспрессией FAP α для дальнейших исследований.

Ключевые слова: белок активации фибробластов α ; FAP α ; TGF β ; фиброз; фибробласты; миофибробласты; CRISPR/cas9; нокаут; гиперэкспрессия.

Tolstoluzhinskaya A.E., Karagyaur M.N., Basalova N.A., Dyachkova U.D., Vigovsky M.N., Efimenko A.Y.

Obtaining human fibroblast lines with modulated expression of the fibroblast activation protein A gene (FAPA)

Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Tissue fibrogenesis is accompanied by an increase in the number of activated stromal cells secreting the fibroblast activation protein α , the role of which is not fully clear. In this work, human fibroblast lines with knockout and overexpression of FAP α were obtained for further research.

Keywords: fibroblast activation protein α ; FAP α ; TGF β ; fibrosis; fibroblasts; myofibroblasts; CRISPR/cas9; knockout; overexpression.

Фиброз органов представляет собой патологическое разрастание соединительной ткани и замещение ею функциональных элементов, что чаще всего сопровождается хроническим воспалением. При этом происходит постоянная секреция профиброгенных факторов, в первую очередь, трансформирующего фактора роста β (TGF β), который, воздействуя на стромальные клетки, может запускать их дифференцировку в миофибробласты. Перед приобретением миофибробластного фенотипа клетки проходят стадию активированного состояния, в которой они отличаются увеличенной пролиферативной и секреторной активностью, повышенной способностью к инвазии, а также экспрессией мембранной протеазы — белка активации фибробластов α (Fibroblast Activation Protein- α , FAP α). На данный момент роль активированных FAP α -положительных фибробластов в развитии фиброза до конца не ясна и во многом противоречива. Одни данные указывают на то, что эти клетки способствуют увеличению пораженной фиброзом площади ткани и тем самым приводят к прогрессированию фиброза. Другие данные свидетельствуют о возможном участии FAP α -положительных фибробластов в реверсии фиброза за счет ремоделирования внеклеточного матрикса. Целью данной работы было получение линий фибробластов человека с модулируемой экспрессией гена FAP α для дальнейшей функциональной оценки кодируемого им белка и уточнения его роли в регуляции свойств стромальных клеток.

В качестве целевых клеток для модификации экспрессии FAP α были использованы первичные культуры фибробластов человека, выделенных из легочной ткани трех различных доноров и дермы двух других доноров. Для подавления экспрессии FAP α использовали две различные системы редактирования генома CRISPR/Cas9: система с Cas9, модифицированная в никазу, и Cas9 с дезаминазной активностью. Для наработки

лентивирусных частиц использовали культуру НЕК. В векторные конструкции дополнительно были встроены гены флуоресцентных белков, позволяющие отсортировать трансдуцированные клетки с помощью проточного сортирования (BD FACS Aria3). Также после получения векторной конструкции и лентивирусной трансдукции целевых клеток были получены линии фибробластов с гиперэкспрессией гена FAP α . Изменения в экспрессии гена оценивали с помощью ПЦР и вестерн-блот анализа до и после добавления фактора TGF β , который способствует переходу фибробластов в активированную форму и повышению уровня FAP α .

Нами были получены целевые векторные конструкции с различными системами редактирования для нокаута в фибробластах, а также конструкция, несущая ген FAP α под сильным промотором с целью создания гиперэкспрессии в клеточных линиях. Мы получили линии легочных и дермальных фибробластов с модифицированной экспрессией FAP α . После редактирования гена системой CRISPR и последующих сортировок наблюдали сильное снижение уровня экспрессии целевого белка в сравнении с контрольными нетрансдуцированными фибробластами, а в некоторых модифицированных культурах его полное отсутствие. При редактировании генома с помощью системы с cas9-никазой клетки ощутили снижение скорости пролиферации (в 3–4 раза), по сравнению с редактированием с помощью системы с дезаминазой, что указывает на преимущества использования последней для дальнейших экспериментов. Также в исходных немодифицированных клетках добавление TGF β приводило к высокому росту экспрессии FAP α с максимумом через 12 часов. Напротив, в культурах с нокаутом гена изменений в уровне экспрессии белка не наблюдалось. Линии, трансдуцированные вектором, кодирующим FAP α , показали значимо более высокий уровень экспрессии этого белка, в том числе при добавлении TGF β .

Таким образом, с помощью редактирования генома с использованием двух модификаций системы CRISPR/Cas9 нам удалось получить линии легочных и дермальных фибробластов человека с подавленной и повышенной экспрессией FAP α . Полученные клеточные линии станут основой для дальнейших исследований, связанных с изучением функций активированных FAP α -положительных фибробластов при фиброзе тканей и органов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>.

Торопов А.Л. ✉, Дерябин П.И., Бородкина А.В.

Развитие рака эндометрия ассоциировано с появлением субпопуляции сенесцентных клеток с иммуномодулирующей активностью

Лаборатория механизмов клеточного старения, ИИЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ toropov.01@bk.ru

Аннотация. Анализ scRNA-seq выявил субпопуляцию сенесцентных эпителиальных клеток, возникающую в процессе развития рака эндометрия, которая, вероятно, участвует в регуляции иммунного ответа в микроокружении опухоли.

Ключевые слова: рак; карцинома эндометрия; клеточная сенесценция; транскриптомика.

Toropov A.L., Deryabin P.I., Borodkina A.V.

Endometrial cancer progression is associated with the emergence of a subpopulation of senescent cells with immunomodulatory activity

Laboratory of Mechanisms of Cellular Senescence, Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Single-cell RNA-seq analysis identified a subpopulation of senescent epithelial cells emerging during endometrial cancer progression, which presumably plays a role in regulating the immune response within the tumor microenvironment.

Keywords: carcinogenesis; endometrial cancer; cellular senescence; transcriptomics.

Эндометриальная эндометриоидная карцинома (ЭЭК) является одной из наиболее распространенных форм рака женской репродуктивной системы. Несмотря на рост темпов заболеваемости ЭЭК, до сих пор нет однозначных данных о механизмах ее прогрессирования. Согласно многим исследованиям *in vitro*, клеточная сенесценция считается одним из защитных противоопухолевых механизмов, что подтверждается наличием сенесцентных клеток в предраковых поражениях и медленно развивающихся опухолях *in vivo*. Однако недавние данные указывают на то, что значительное количество сенесцентных клеток может также присутствовать в раковой ткани [1]. Неясные причины возникновения, а также меж- и внутриопухолевая гетерогенность затрудняют установление физиологической роли сенесцентных клеток. Для определения роли сенесцентных клеток в развитии рака эндометрия мы провели анализ открытых данных РНК-секвенирования одиночных клеток (scRNA-seq) образцов эндометрия, которые иллюстрируют поэтапный процесс онкогенеза.

Данные scRNA-seq были получены из базы данных NCBI SRA (SRP349751) и включали образцы от 15 доноров: 5 доноров нормального эндометрия, 5 — атипичной гиперплазии эндометрия и 5 — карциномы эндометрия. Для предварительной обработки данных, аннотации клеточных типов и анализа дифференциальной экспрессии генов были использованы функции программной библиотеки Seurat. Показатели обогащения по геной сигнатуре сенесценции Брозенса [2] мы использовали для выявления сенесцентных эпителиальных клеток. Раковые клетки определяли по показателям геномной нестабильности: уровню CNV (вариации числа копий генов) и MSI (микросателлитной нестабильности) с помощью инструментов inferCNV и MSIsensor-RNA. Для анализа лиганд-рецепторных взаимодействий между сенесцентными и иммунными клетками был использован пакет CommPath.

Среди эпителиальных клеток эндометрия мы идентифицировали субпопуляцию сенесцентных клеток, которая характеризовалась высоким уровнем обогащения по генной сигнатуре сенесценции и выявлялась как на стадии гиперплазии, так и на стадии карциномы эндометрия. Между опухолевыми образцами была выявлена значительная гетерогенность по признакам геномной нестабильности, однако субпопуляция клеток с признаками сенесценции присутствовала во всех образцах с патологическими изменениями эндометрия. Кроме того, сенесцентная субпопуляция демонстрировала высокий уровень взаимодействия с различными типами иммунных клеток за счет экспрессии генов хемокинов (CXCL1, CXCL3 и др.), компонентов системы комплемента (C3), а также некоторых факторов, связанных с негативной регуляцией иммунного ответа (LGALS9, ANXA1).

Таким образом, мы установили, что прогрессирование рака эндометрия связано с появлением субпопуляции сенесцентных клеток, которые, вероятно, играют роль в модуляции иммунного ответа против опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 24-74-10002).

Список литературы

1. Park S.S., Choi Y.W., Kim JH., et al. Senescent tumor cells: an overlooked adversary in the battle against cancer // *Exp Mol Med*. 2021. Vol. 53, N 12. P. 1834–1841. doi: 10.1038/s12276-021-00717-5
2. Rawlings T.M., Makwana K., Taylor D.M., et al. Modelling the impact of decidual senescence on embryo implantation in human endometrial assembloids // *Elife*. 2021. Vol. 10. doi: 10.7554/eLife.69603

Трубкина Е.И.^{1,2} ✉, Болдырева М.А.¹, Агарева М.Ю.^{1,3}, Мичурина С.С.^{1,3}, Стафеев Ю.С.¹, Парфёнова Е.В.^{1,3}

Смещение баланса дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток *Acomys* sp. в остеогенном направлении

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» МЗ РФ, Москва, Россия

² Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ elizaveta.trubkina04@gmail.com

Аннотация. *Acomys* sp. (иглистые мыши) обладают уникальными регенеративными способностями и схожим с людьми проявлением ожирения. Изучение механизмов, регулирующих МСК ЖТ у *Acomys* sp., важно для поиска новых подходов к лечению ожирения и связанных с ним заболеваний.

Ключевые слова: *Acomys* sp.; мезенхимальные стволовые клетки; остеогенез; адипогенез.

Trubkina E.^{1,2}, Boldyreva M.¹, Agareva M.^{1,3}, Michurina S.¹, Stafeev I.¹, Parfyonova Ye.^{1,3}

Shift in balance of mesenchymal stem cell differentiation of *Acomys* sp. towards osteogenesis

¹ National Medical Research Centre of Cardiology named after academician E.I. Chazov, Moscow, Russia

² National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

³ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. *Acomys* sp. (spiny mice) possess unique regenerative abilities and exhibit obesity similar to humans. Studying the mechanisms regulating adipose tissue MSCs in *Acomys* sp. is important for developing new approaches to treating obesity and related diseases.

Keywords: *Acomys* sp.; mesenchymal stem cells; osteogenesis; adipogenesis.

Acomys sp., или иглистые мыши, известны своими исключительными регенеративными способностями: они способны эффективно восстанавливать поврежденные ткани и органы. Одной из интересных особенностей является схожесть фенотипа пищевого поведения и проявления ожирения у *Acomys* sp. с аналогичными процессами у человека. Известно, что у людей, страдающих ожирением, часто наблюдается сдвиг дифференцировки МСК ЖТ в сторону остеогенеза, тогда как адипогенез происходит менее эффективно. Учитывая, что ожирение и связанные с ним заболевания остаются одной из глобальных проблем здравоохранения, изучение механизмов, регулирующих МСК ЖТ у *Acomys* sp., может способствовать развитию новых методов борьбы с этими нарушениями.

В ходе экспериментов использовали МСК ЖТ, выделенные из жировой ткани *Acomys* sp. и C57BL-6. Клетки подвергали остеогенной дифференцировке на протяжении 28 дней по стандартному протоколу. Степень минерализации оценивали с помощью окрашивания ализариновым красным S, который связывается с кальциевыми отложениями, после чего проводили экстракцию красителя для количественного анализа. Дополнительно, с помощью ПЦР в реальном времени, оценивали экспрессию ключевых маркеров остеогенеза, включая RUNX2, основного регулятора дифференцировки остеобластов, и SPP1 (остеопонтин), гликопротеина, участвующего в костной минерализации. Дифференцировку адипоцитов проводили в течение 21 дня по стандартному протоколу, эффективность адипогенеза оценивали с помощью окрашивания флуоресцентным красителем BODIPY, который связывается с липидными каплями. Также с помощью ПЦР в реальном времени измеряли экспрессию маркеров адипогенеза: PPAR γ , AdipoQ.

Результаты показали, что МСК ЖТ у *Acomys* sp. демонстрируют значительно более выраженную остеогенную дифференцировку по сравнению с C57BL/6. Это подтверждается интенсивным окрашиванием ализарином и повышенной экстракцией красителя, что указывает на активную минерализацию, а также высоким уровнем экспрессии RUNX2 и SPP1, что вместе свидетельствует о высоком остеогенном потенциале этих клеток. Однако, несмотря на столь выраженный остеогенный потенциал, адипогенез у *Acomys* sp. проходит неэффективно, что выражается в слабой дифференцировке адипоцитов и низкой экспрессии адипогенных маркеров.

Таким образом, исследование демонстрирует уникальные свойства МСК ЖТ *Acomys* sp., которые показывают высокий остеогенный потенциал, но недостаточную способность к адипогенезу. Такие же особенности характерны для МСК ЖТ пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. Эти данные подчеркивают важность дальнейшего изучения механизмов регуляции клеточной дифференцировки у *Acomys* sp. с целью разработки новых стратегий для лечения ожирения и связанных с ним патологий.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-15-00308.

Турчанинова Е.А.^{1,2} ✉, Аитова А.А.¹, Романова С.А.¹, Коваленко С.Г.¹, Цвелая В.А.^{1–3},
Слотвицкий М.М.^{1–3}, Агладзе К.И.^{1,3}

Разработка новых протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты с помощью биоинформатического прогнозирования сигнальных путей

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

✉ turchaninova.ea@phystech.edu

Аннотация. Чрезмерное количество несократимых клеток в сердечной ткани может мешать распространению электрических сигналов. Работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов в кардиомиоциты и представляет собой потенциал при лечении сердечно-сосудистых заболеваний.

Ключевые слова: прямое репрограммирование; кардиомиоциты; фиброз; регенеративная персонализированная медицина.

Turchaninova E.A.^{1,2}, Aitova A.A.¹, Romanova S.A.¹, Kovalenko S.G.¹, Tselaya V.A.^{1–3},
Slotvitsky M.M.^{1–3}, Agladze K.I.^{1,3}

Development of new protocols for chemical transdifferentiation of fibroblasts into cardiomyocytes using bioinformatics prediction of signaling pathways

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² ITMO University, Saint Petersburg, Russia

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Abstract. Excessive numbers of non-contractile cells in cardiac tissue can interfere with the propagation of electrical signals. The work is devoted to the development of protocols for the chemical transdifferentiation of fibroblasts into cardiomyocytes, which have potential in the treatment of cardiovascular diseases.

Keywords: direct reprogramming; cardiomyocytes; fibrosis; regenerative personalized medicine.

Нарушение нормального режима распространения электромеханических волн возбуждения в сердечной ткани может стать причиной сердечной аритмии, асинхронных сердечных сокращений и даже способно привести к остановке сердца. Электромеханические волны возбуждения передают возбудимые клетки сердца, кардиомиоциты. В результате ишемии или других патологий они могут замещаться непроводящими клетками, фибробластами. Чрезмерное содержание фибробластов в сердечной ткани мешает распространению волн возбуждения по сердечной ткани, такие нарушения называют фиброзом.

Данная работа посвящена разработке протоколов химической трансдифференцировки фибробластов напрямую в кардиомиоциты для уменьшения фибротических повреждений сердечной ткани [1–2]. Осуществление прямого репрограммирования без стадий эмбрионального клеточного развития позволит осуществить новые подходы в области терапии фиброзных изменений сердца [3–4]. Основной целью работы было создание новых протоколов трансдифференцировки из фибробластов в кардиомиоциты с повышенной эффективностью и проверкой функциональности получаемых клеток. В задачи работы входили подбор

и постановка контрольных протоколов трансдифференцировки для фибробластов животных [5], их последующая модификация и разработка протоколов трансдифференцировки для фибробластов человека на основе контрольных.

Полученные в ходе трансдифференцировки кардиомиоциты были проанализированы с точки зрения функциональной и электрофизиологической зрелости, протоколы апробированы для мышинных, крысиных и человеческих фибробластов. Работа представляет собой новый потенциальный вариант применения регенеративной медицины в области сердечно-сосудистых заболеваний.

Список литературы

1. Mohamed T.M., Stone N.R., Berry E.C., et al. Chemical enhancement of *in vitro* and *in vivo* direct cardiac reprogramming // *Circulation*. 2017. Vol. 35, N 10. P. 978–995. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024692
2. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., et al. Chemically defined and small molecule-based generation of human cardiomyocytes // *Nat Methods*. 2014. Vol. 11, N 8. P. 855–860. doi: 10.1038/nmeth.2999
3. Lian X., Zhang J., Azarin S.M., et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions // *Nature Protocols*. 2013. Vol. 8, N 1. P. 162–175. doi: 10.1038/nprot.2012.150
4. Lai P.L., Lin H., Chen S.F., et al. Efficient generation of chemically induced mesenchymal stem cells from human dermal fibroblasts // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7. doi: 10.1038/srep44534
5. Fu Y., Huang C., Xu X., et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts into cardiomyocytes with chemical cocktails // *Cell Research*. 2015. Vol. 25, N 9. P. 1013–1024. doi: 10.1038/cr.2015.99

Тюмина О.В.^{1,2} ✉, Давыдкин И.Л.², Гриценко Т.А.², Овчинников П.А.¹

Оценка безопасности и эффективности трансфузии аллогенной пуповинной крови пациентам с онкогематологическими заболеваниями

¹ ГБУЗ «МЦ Династия», Самара, Россия

² ФГБУ ВО СамГМУ МЗ РФ, Самара, Россия

✉ centr123@bk.ru

Аннотация. В работе проведена оценка безопасности и эффективности трансфузии гематопозитических стволовых клеток аллогенной пуповинной крови пациентам с рефрактерной множественной миеломой.

Ключевые слова: гематопозитические стволовые клетки; пуповинная кровь.

Tyumina O.V.^{1,2}, Davydkin I.L.², Gritsenko T.A.², Ovchinnikov P.A.¹

Assessment of the safety and effectiveness of allogeneic cord blood transfusion in patients with refractory hematological diseases

¹ GBUZ "MC Dynasty", Samara, Russia

² Federal State Budgetary Institution of Higher Education SamSMU Ministry of Health of the Russian Federation, Samara, Russia

Abstract. The work assessed the safety and efficacy of transfusion hematopoietic allogeneic stem cells over allogeneic umbilical cord blood summary of the results in patients with refractory multiple myeloma.

Keywords: hematopoietic dose stem cells; umbilical cord blood.

Тяжелые иммунные дисфункции имеют место у большинства онкологических пациентов. Одним из методов преодоления иммунных нарушений является трансплантация гематопозитических стволовых клеток периферической крови как аутологичных, так и аллогенных, трансфузии аллогенных натуральных киллерных клеток (NK-клеток) [1]. Пуповинная кровь является известным источником не только гематопозитических стволовых клеток (ГСК), но также и NK-клеток, характеризуется быстрой доступностью образцов крови из публичных банков пуповинной крови [2]. Цель исследования: проанализировать безопасность и эффективность одновременной трансфузии трех концентратов ГСК аллогенной пуповинной крови пациентам с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой в течение 60 дней после введения. Материал и методы: в пилотное исследование включено 10 пациентов (7 мужчин и 3 женщин) с рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломой (ММ), ранее получивших более 3 линий терапии. Возраст пациентов — $59,4 \pm 3,4$ года, всем проводилась однократная трансфузия трёх аллогенных образцов концентрата ГСК пуповинной крови со средней дозой лейкоцитов $60,50 \pm 8,2 \times 10^8$ (NK-клетки — $4,36 \pm 1,2 \times 10^8$) на одного пациента. Всего проведена трансфузия 30 образцов концентрата ГСК пуповинной крови, аллореактивных по KIR-рецепторам по типу рецептор-лиганд. Подбор концентратов ГСК осуществлялся в банке пуповинной крови ГБУЗ «МЦ Династия». Перед трансфузией концентрата ГСК пуповинной крови пациенты получали циклофосфамид 5 мг/кг. После трансфузии пациенты получали пять подкожных инъекций IL-2 (ронколейкина) в количестве 1 млн ЕД в сутки. Наблюдение на момент оценки предварительных результатов — 3 месяца после окончания протокола лечения. Результаты: ранних и поздних (в течение 3-го месяца после окончания лечения) нежелательных реакций на трансфузии не наблюдалось. У 3 (30%) пациентов была зафиксирована полная элиминация секреции парапротеина. У 3 (30%) пациентов отмечено снижение уровня парапротеина на 28% (с 9,07 до 6,53 г/л), что также свидетельствует о положительной динамике в лечении. У 2 (20%)

пациентов было зафиксировано стабильное состояние, отсутствие увеличения парапротеина. Заключение. Трансфузия аллогенной пуповинной крови у пациентов с рецидивирующей/рефрактерной ММ является безопасным методом лечения. Побочных реакций и серьёзных нежелательных явлений не зарегистрировано.

Частота общего ответа на применение метода составила 80%, и она сохранялась на протяжении 3 месяцев наблюдения после окончания протокола лечения.

Список литературы

1. Mehta R.S., Randolph B., Daher M., et al. NK cell therapy for hematologic malignancies // *Int J Hematol.* 2018. Vol. 107, N 3. P. 262–270. doi: 10.1007/s12185-018-2407-5
2. Damele L., Spaggiari G.M., Parodi M., et al. Cord blood-derived natural killer cell exploitation in immunotherapy protocols: more than a promise? // *Cancers.* 2022. Vol. 14. P. 4439. doi: 10.3390/cancers14184439

Тюрин-Кузьмин П.А. ✉, Воронцова М.В., Кулебякин К.Ю., Ткачук В.А.

Выбор направления и определение траектории дифференцировки постнатальных стволовых клеток

Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ tyurinkuzmin.p@gmail.com

Аннотация. Выбор направления дифференцировки постнатальных стволовых клеток (СК) осуществляется под влиянием нескольких последовательно действующих гормональных сигналов. Гормональные сигналы поочередно изменяют функциональное состояние СК, определяя выбор направления и траекторию дифференцировки СК.

Ключевые слова: постнатальные стволовые клетки; мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; адипогенная дифференцировка; бежевые адипоциты; выбор направления дифференцировки; норадреналин; регуляторные субпопуляции.

Tyurin-Kuzmin P.A., Vorontsova M.V., Kulebyakin K.Yu., Tkachuk V.A.

Determination of direction and trajectory of postnatal stem cells differentiation

Department of biochemistry and regenerative biomedicine, Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. The choice of the direction of differentiation of postnatal stem cells requires a combination of sequentially acting hormonal stimuli. Hormonal stimuli step-by-step change functional activity of stem cells, determining the choice of direction and determining the trajectory of differentiation of postnatal stem cells.

Keywords: postnatal stem cells; multipotent mesenchymal stromal cells; adipogenic differentiation; beige adipocytes; selection of differentiation direction; noradrenaline; regulatory subpopulations.

Метаболические болезни, связанные с нарушениями обновления и регенерации жировой ткани, приобрели характер мировой проблемы. Сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет и метаболический синдром являются ведущими причинами инвалидизации и ранней смертности людей. Ключевой причиной развития ожирения является нарушение процессов обновления жировой ткани, в основе которого лежит особый подтип стволовых клеток взрослого организма, мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). МСК обеспечивают постоянное обновление жировой ткани, превращаясь в различные типы клеток жировой ткани, такие как белые адипоциты, бежевые адипоциты, регуляторные клетки, формирующие внеклеточный матрикс, гладкомышечные клетки. МСК проявляют функциональную гетерогенность, которая проявляется в различной чувствительности отдельных клеток к гормонам-регуляторам функционирования жировой ткани. МСК регулируются целым рядом эндокринных и паракринных сигналов, среди которых норадреналин, серотонин и ангиотензин II играют ключевую роль в регуляции дифференцировки этих стволовых клеток. Более того, в МСК показаны уникальные механизмы переключения гормональной чувствительности и внутриклеточных сигнальных каскадов, которые лежат в основе комплексной регуляции функциональной активности этих клеток [1].

В своей работе мы использовали методы анализа внутриклеточных сигнальных каскадов на уровне одиночных клеток для регистрации функциональной гетерогенности МСК [2] и стандартные протоколы дифференцировки клеток, совмещенные с протоколами наблюдения за дифференцировочной судьбой единичных клеток. Кроме того, мы использовали методы определения транскриптома на уровне единичных клеток,

которые позволили выявить функциональные субпопуляции в культуре МСК человека [3]. Мы обнаружили, что большинство клеток в популяции МСК несли на своей поверхности рецепторы ко множеству гормонов. Несмотря на это, на конкретный индивидуальный гормон была способна отвечать лишь небольшая доля клеток в популяции. При этом группы клеток, воспринимающие определенный гормон, характеризовались определенной функцией, которую они выполняли в рамках функционирования целостной ткани. Мы показали функциональные субпопуляции МСК, в рамках которых клетки отвечали на действие гормона единообразно и обладали сходным дифференцировочным потенциалом. Мы показали, что на самых начальных этапах активации МСК переходят в состояние, в котором они приобретают способность к выбору направления дифференцировки (иницированное состояние). В этом состоянии МСК обладают свойствами стволовой клетки, описанными в литературе для клеток, вышедших из ниши. Переход МСК в инициированное состояние наблюдается под влиянием катехоламинов за счет стимуляции $\beta 3$ -адренорецепторов. При этом происходит повышение чувствительности клеток к норадреналину, сопряженное с экспрессией $\alpha 1A$ -адренорецепторов за счет синтеза цАМФ, активации протеинкиназы А и повышения трансляции, но не транскрипции $\alpha 1A$ -адренорецепторов и не активации цАМФ-зависимых транскрипционных факторов [4–5]. Этот сигнальный феномен является уникальным для клеток взрослого организма человека. После повышения уровня $\alpha 1A$ -адренорецепторов МСК приобретали способность к кальциевой сигнализации в ответ на действие катехоламинов. Этот феномен был связан с выбором направления дифференцировки МСК между контрактильным фенотипом и теплопродуцирующими бежевыми адипоцитами. Таким образом, МСК проявляли функциональную гетерогенность, которая связана с дифференцировочным потенциалом отдельных клеток популяции МСК.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 19-75-30007 (<https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

Список литературы

1. Chechekhin V.I., Kulebyakin K., Kokaev R.I., et al. GPCRs in regulation of functional activity of multipotent mesenchymal stromal cells // *Front Cell Dev Biol.* 2022. Vol. 10. doi: 10.3389/fcell.2022.953374
2. Chechekhin V.I., Kulebyakin K.Y., Kalinina N.I., et al. Noradrenaline and serotonin-dependent sensitization of MSCs to noradrenaline // *MethodsX.* 2024. Vol. 12. doi: 10.1016/j.mex.2024.102587
3. Хозяинова А.А., Валяева А.А., Арбатский М.С., и др. Возможности комплексного анализа данных секвенирования РНК единичных клеток // *Биохимия.* 2023. Т. 88, № 2. С. 171–198. EDN: QFSJMW doi: 10.1134/S0006297923020074
4. Chechekhin V.I., Ivanova A.M., Kulebyakin K.Y., et al. Peripheral 5-HT/HTR6 axis is responsible for obesity-associated hypertension // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2024. Vol. 1871, N 2. doi: 10.1016/j.bbamcr.2023.119651
5. Chechekhin V., Ivanova A., Kulebyakin K., et al. Alpha1A- and beta3-adrenoceptors interplay in adipose multipotent mesenchymal stromal cells: a novel mechanism of obesity-driven hypertension // *Cells.* 2023. Vol. 12, N 4. P. 585. doi: 10.3390/cells12040585

Усакин Л.А.¹✉, Максимова Н.В.², Пантелеев А.А.¹

Ассоциация однонуклеотидного полиморфизма rs7903146 в гене TCF7L2 с синдромом диабетической стопы

¹ НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, Россия

✉ leousakin@gmail.com

Аннотация. Синдром диабетической стопы — осложнение диабета 2-го типа, проявляющееся в виде хронических язв кожи нижних конечностей из-за нарушения процесса регенерации эпителия. Аллель t rs7903146 в гене TCF7L2, известный фактор риска диабета 2-го типа, показал защитный эффект от СДС с $OR(95\%) = 0,68(0,48–0,96)$.

Ключевые слова: SNP; генетическая ассоциация; диабет; диабетическая язва; регенерация.

Usakin L.A.¹, Maksimova N.V.², Panteleyev A.A.¹

Association of single nucleotide polymorphism rs7903146 in the TCF7L2 gene with diabetic foot ulcer

¹ NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Diabetic foot ulcer is a complication of type 2 diabetes, manifested as chronic ulcers of the skin of lower extremities due to impairment of the epithelial regeneration process. The t allele rs7903146 in the TCF7L2 gene, a known risk factor for type 2 diabetes, showed a protective effect against DFU with $OR(95\%) = 0.68(0.48–0.96)$.

Keywords: SNP; genetic association; diabetes; diabetic ulcer; regeneration.

Синдром диабетической стопы (СДС) является одним из самых тяжёлых осложнений диабета 2-го типа, которое проявляется в виде незаживающих (хронических) язв кожи нижних конечностей вследствие нарушения эпителиальной регенерации. Лечение СДС остаётся сложным, трудоёмким и весьма дорогим, несмотря на наличие хорошо отработанных протоколов. Раннее прогнозирование потенциального развития СДС у диабетиков может значительно снизить негативные последствия этого осложнения.

Для оценки потенциальных генетических маркеров СДС группа пациентов из Московской области с диабетом 2-го типа с СДС и без СДС была генотипирована по ряду однонуклеотидных полиморфизмов.

Аллель t rs7903146 в гене *TCF7L2*, известный как один из наиболее значимых факторов риска диабета 2-го типа, показал защитный эффект от СДС с $OR(95\%) = 0,68(0,48–0,96)$. Этот эффект аллеля t rs7903146 на предрасположенность к СДС подразумевает, что присутствие этого аллеля увеличивает вероятность развития диабета 2-го типа, но в то же время снижает вероятность появления СДС.

Ген *Tcf7L2* кодирует белок семейства транскрипционных факторов, специфичных для Т-клеток (T-cell specific), которые активируются бета-катенином, опосредуют регуляторный путь WNT и являются антагонистами TNF. Факторы транскрипции семейства Tcf играют важную роль в различных тканях, включая эмбриональную кожу. Ранее было показано, что Tcf3 (Tcf7l1) и Tcf4 (Tcf7l2) незаменимы для поддержания долгосрочного гомеостаза в коже мышей. В кожных трансплантатах мышей Tcf3/4-null не наблюдалось регенерации эпителия из-за неспособности поддерживать долгосрочное самообновление популяции стволовых клеток в эпидермисе. Недавно также было показано, что ген *TCF7L2* подавлен в макрофагах M1 из образцов стоп пациентов с СДС, у которых наблюдался процесс ремиссии.

Выявление ассоциации *TCF7L2* с СДС в нашем исследовании является первым и весьма значимым наблюдением, так как оно проливает новый свет на роль нарушения эпителиальной регенерации в патогенезе СДС.

Усанова А.П.¹✉, Гилязова А.Н.¹, Волошин С.Ю.¹, Антошин А.А.¹, Демур Т.А.², Тимашев П.С.¹

Применение лактоферрин-содержащих коллагеновых матриц для регенерации кожных покровов

¹ Институт регенеративной медицины, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Институт клинической морфологии и цифровой патологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

✉ usanova_a_p@staff.sechenov.ru

Аннотация. В ходе данного исследования оценивался терапевтический потенциал лактоферрина на *in vitro* и *in vivo* моделях. Тесты на клетках кожи человека показали повышенную пролиферацию и миграцию, а эксперименты на мышах подтвердили ускоренное заживление ран и регенерацию кожи.

Ключевые слова: регенерация кожи; коллагеновые покрытия; лактоферрин; первичные клетки кожи.

Usanova A.P.¹, Giliyazova A.N.¹, Voloshin S.Y.¹, Antoshin A.A.¹, Demura T.A.², Timashev P.S.¹

Application of lactoferrin-containing collagen matrices for skin regeneration

¹ Institute for Regenerative Medicine, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

² Institute of Clinical Morphology and Digital Pathology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Abstract. During this study, the therapeutic potential of lactoferrin was evaluated using *in vitro* and *in vivo* models. Tests on human skin cells showed increased proliferation and migration, while experiments on mice confirmed accelerated wound healing and skin regeneration.

Keywords: skin regeneration; collagen matrices; lactoferrin; primary skin cells.

Исследования процессов заживления кожных ран являются фундаментальным направлением в медицине, привлекающим внимание специалистов на протяжении всей истории развития медицинской науки. Вопреки наличию многочисленных местных и хирургических методов лечения ран, постоянное усовершенствование терапевтических методов остается ключевой задачей для специалистов в этой области. Традиционно применяемая для лечения обширных ран аутодермопластика, несмотря на свою эффективность, часто ассоциируется с высокими травматическими рисками, поэтому современные методы все чаще основываются на использовании биодеградируемых коллагеновых покрытий.

В рамках данного исследования в коллагеновое покрытие был импрегнирован лактоферрин. Лактоферрин представляет собой железосвязывающий гликопротеин, который естественным образом присутствует в теле человека. Как прорегенеративный агент, лактоферрин имеет огромный терапевтический потенциал для восстановления повреждений кожи.

На первом этапе исследования проводилась оценка влияния лактоферрина на первичные клетки кожи человека, выделенные из тканей здоровых доноров: кератиноциты, фибробласты и мезенхимальные стволовые клетки. Результаты эксперимента продемонстрировали выраженное стимулирующее влияние на пролиферацию и миграционную активность перечисленных типов клеток.

На втором этапе методом электроосаждения были получены коллаген-лактоферриновые покрытия, которые тестировались на мышах. Разработанные покрытия были имплантированы в острую полнослойную рану, сформированную хирургическим путем. Дальнейшее наблюдение включало визуальную оценку и ведение на ранней и поздней контрольных точках — 7-й и 21-й день. Образцы тканей были окрашены

гистологическими и иммунофлуоресцентными методами на основные кожные маркеры. Съёмку осуществляли на сканирующем конфокальном микроскопе.

Используя *in vitro* и *in vivo* модели, было показано, что лактоферрин стимулирует пролиферацию и миграцию клеток кожи в условиях *in vitro*. Коллаген-лактоферриновые покрытия, полученные методом электрофоретического осаждения, обеспечивают более быстрое заживление кожных ран на модели острой полнослойной раны у мышей. Путем гистологического анализа была продемонстрирована ускоренная регенерация кожных покровов после применения коллаген-лактоферриновых покрытий, что делает лактоферрин перспективным прорегенеративным агентом, который в будущем может быть использован для лечения кожных ран.

Усатова В.С.¹ ✉, Мишина Н.М.^{2,3}, Берестовой М.А.¹, Иваненко А.В.^{3,4}, Джэппи Д.¹, Круть В.Г.^{1,2}, Соколов Р.А.², Мощенко А.А.¹, Розов А.В.¹, Шевченко Е.К.¹, Белоусов В.В.^{1–3}

Нейральные сфероиды в исследовании ишемии-реперфузии

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА, Москва, Россия

² РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

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

⁴ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

✉ nikausatova@gmail.com

Аннотация. Исследована динамика образования пероксида водорода при ишемии-реперфузии в нейральных сфероидах, стабильно экспрессирующих генетически кодируемый флуоресцентный сенсор HyPer7. В результате мы не обнаружили увеличения концентрации пероксида водорода ни в острой стадии ишемии, ни при реперфузии, а также через 24 часа после реперфузии.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека; нейральные сфероиды; ишемия-реперфузия; кислородно-глюкозная депривация; пероксид водорода; генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры; прижизненная визуализация; CRISPR/Cas9.

Usatova V.S.¹, Mishina N.M.^{2,3}, Berestovoy M.A.¹, Ivanenko A.V.^{3,4}, Jappy D.¹, Krut' V.G.^{1,2}, Sokolov R.A.², Moshchenko A.A.¹, Rozov A.V.¹, Shevchenko E.K.¹, Belousov V.V.^{1–3}

Ischemia-reperfusion injury studies on neural spheroids

¹ Federal Center of Brain Research and Neurotechnologies of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

³ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia

⁴ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. We report of hydrogen peroxide dynamics in the acute phase of ischemia-reperfusion on the human induced pluripotent stem cells-derived neural spheroids, expressing a genetically encoded fluorescent sensor HyPer7. We did not detect the hydrogen peroxide production burst either during the acute phase of ischemia or reperfusion and 24 hours after reperfusion.

Keywords: iPSC-derived neural spheroids; ischemia-reperfusion; oxygen-glucose deprivation; hydrogen peroxide; genetically encoded fluorescent biosensors; live imaging; CRISPR/Cas9

Заболевания, характеризующиеся ишемически-реперфузионным повреждением (ИРП) тканей мозга, продолжают оставаться одной из наиболее частых причин смерти и инвалидизации по всему миру. Считается, что активные формы кислорода (АФК) играют решающую роль в патофизиологии ИРП [1, 2]. Однако до сих пор не выяснен точный момент генерации АФК — стадия гипоксии или реперфузии, при которой происходит быстрое восстановление количества кислорода. Кроме того, пока не до конца понятно, какой тип клеток ответственен за избыточную продукцию АФК. Такое непонимание молекулярных механизмов окислительного стресса в патофизиологии ИРП во многом связано с тем, что существующие в настоящее время подходы являются в основном косвенными. Для детального изучения динамики продукции АФК в реальном времени при моделировании ИРП в живых клетках в настоящее время стали доступны генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры.

В данной работе для исследования молекулярных механизмов окислительного стресса в патофизиологии ИРП нами был использован генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор HyPer7 [3], позволяющий

детектировать генерацию пероксида водорода, одной из самых реакционноспособных АФК. С помощью системы для геномного редактирования CRISPR-Cas9 мы ввели биосенсор *HyPer7* в ИПСК здорового донора, которые затем дифференцировали в нейральные сфероиды (*HyPer7*-нейросфероиды). Далее, используя ранее описанный нами метод [4], мы моделировали ИПП и оценили степень окислительного стресса в режиме реального времени в полученных нейральных сфероидах. В эксперименте были использованы 2–6-недельные *HyPer7*-нейросфероиды. Используемая нами установка позволяет точно контролировать и быстро детектировать изменения уровня кислорода в среде в процессе флуоресцентной микроскопии живых сфероидов на всех этапах эксперимента. Генерацию пероксида водорода визуализировали на флуоресцентном конфокальном микроскопе в заданной 2D-плоскости конфокального изображения. Кроме того, непосредственно перед перфузией среды и сразу после нее были получены z-стеки *HyPer7*-нейросфероидов. Также были получены 3D-изображения *HyPer7*-нейросфероидов через 24 часа после реперфузии и после добавления пероксида водорода.

В эксперименте мы не наблюдали изменения динамики образования пероксида водорода на этапах острой ишемии и реперфузии в *HyPer7*-нейросфероидах. Анализ 3D-изображений *HyPer7*-нейросфероидов не выявил существенной разницы в уровнях окисления *HyPer7* до и после эксперимента по моделированию ИПП, а также через 24 часа после реперфузии. Добавление пероксида водорода к *HyPer7*-нейросфероидам через 24 часа после реперфузии изменяло сигнал *HyPer7*, т.е. биосенсор находился в восстановленном состоянии до окисления пероксидом водорода. Таким образом, в результате наших исследований мы не обнаружили всплеска образования пероксида водорода ни в острой стадии ишемии, ни при реперфузии, а также через 24 часа после реперфузии. Следовательно, полученные из ИПСК нейральные сфероиды, не имеющие в своем составе клеток микроглии и эндотелия, вероятно, не являются оптимальной моделью ИПП.

Список литературы

1. Qin C., Yang S., Chu Y.H., et al. Signaling pathways involved in ischemic stroke: molecular mechanisms and therapeutic interventions // *Sig Transduct Target Ther.* 2022. Vol. 7, N 1. P. 215. doi: 10.1038/s41392-022-01064-1
2. Abo M., Weerapana E. Chemical probes for redox signaling and oxidative stress // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. Vol. 30, N 10. P. 1369–1386. doi: 10.1089/ars.2017.7408
3. Pak V.V., Ezeriņa D., Lyublinskaya O.G., et al. Ultrasensitive genetically encoded indicator for hydrogen peroxide identifies roles for the oxidant in cell migration and mitochondrial function // *Cell Metab.* 2020. Vol. 31, N 3. P. 642–653. doi: 10.1016/j.cmet.2020.02.003
4. Kelmanson I.V., Shokhina A.G., Kotova D.A., et al. *In vivo* dynamics of acidosis and oxidative stress in the acute phase of an ischemic stroke in a rodent model // *Redox Biol.* 2021. doi: 10.1016/j.redox.2021.102178

Усачёв В.А.¹✉, Кулебякин К.Ю.¹, Тюрин-Кузьмин П.А.¹, Волошин Н.С.¹, Зубарев И.В.², Николаев М.Ю.¹, Воронцова М.В.¹

Ключевая роль аденилатциклазы 1 в регулировании дифференцировочного потенциала МСК

¹ МНОИ ФФМ, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² МФТИ, Москва, Россия

✉ usachjov-vova@mail.ru

Аннотация. Ключевым гормоном-регулятором обновления костной ткани является паратиреоидный гормон (ПТГ). Мы обнаружили, что аденилатциклаза 1 является не только ключевым звеном дифференцировки МСК, но также опосредует простегенное действие паратиреоидного гормона.

Ключевые слова: остеогенная дифференцировка; ПТГ; аденилатциклаза; МСК.

Usachev V.A.¹, Kulebyakin K.Yu.¹, Tyurin-Kuzmin P.A.¹, Voloshin N.S.¹, Zubarev I.V.², Nikolaev M.Yu.¹, Vorontsova M.V.¹

Key role of ADCY1 in regulation of differentiation potential of MSC

¹ Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² MIPT, Moscow, Russia

Abstract. Parathyroid hormone is the key hormone regulating bone tissue renewal. We observed what ADCY1 is not only a key component of MSC differentiation, but also mediates the osteogenic action of PTH.

Keywords: Osteogenic differentiation; PTH; ADCY; MSC.

Костная ткань способна к самообновлению и поддержанию на протяжении всей жизни. В основе этого процесса лежит динамический баланс между резорбцией и образованием костной ткани. Как и любое самообновление, оно находится под строгим контролем со стороны организма, осуществляемом за счет активности эндокринной системы. Ключевым гормоном-регулятором обновления костной ткани является паратиреоидный гормон (ПТГ). Несмотря на значительные потенциальные преимущества его использования в терапии для восстановления костной ткани, его практическое применение ограничивается фактом наличия различных непредсказуемых побочных эффектов, таких как повышенная резорбция кости или формирование кальцификатов мягких тканей. Это проистекает из того факта, что ПТГ способен оказывать различное действие на мезенхимные стволовые клетки (МСК) — клетки, обеспечивающие обновление стромальных тканей (к которым относится и костная ткань). Так, на МСК жировой ткани ПТГ действует проosteогенно, а на МСК надкостницы он оказывает антиosteогенный эффект. В связи с этим мы попытались установить механизм проosteогенного действия ПТГ.

Мы оценили кальциевый ответ одиночных клеток МСК из различных депо и обнаружили 3 различных варианта кальциевых ответов клеток на ПТГ: плавное повышение уровня внутриклеточного кальция, кальциевые осцилляции и одиночные пики [1]. МСК, выделенные из разных источников, демонстрируют все три варианта кальциевых ответов, но с различным паттерном. В МСК жировой ткани преобладали клетки, отвечающие на ПТГ плавным приростом кальция, а МСК надкостницы, наоборот, отвечали преимущественно осцилляциями.

Для выяснения причины различных паттернов кальциевых ответов на паратиреоидный гормон мы провели ингибиторный анализ аденилатциклазного и фосфолипазного сигнальных путей и обнаружили феномен унификации кальциевых сигнальных ответов вне зависимости от источника, из которого получены МСК.

Более того, ингибирование сигнальных путей привело к унификации влияния паратиреоидного гормона на остеогенную дифференцировку: ингибирование аденилатциклазы приводило к тому, что ПТГ оказывал антиостеогенное действие, и, наоборот, ингибирование фосфолипазы С приводило к остеогенному действию ПТГ. Следовательно, аденилатциклазный сигнальный каскад является ключевым для реализации проостеогенного эффекта паратиреоидного гормона.

Однако аденилатциклазы представляют обширное семейство из 1 растворимой и 9 мембранных изоформ ферментов [2]. Кажущаяся избыточность изоформ аденилатциклаз и роль отдельных изоформ в процессах дифференцировки к настоящему моменту недостаточно ясна. Мы изучили представленность мембранных изоформ аденилатциклаз в МСК при индукции остеогенной дифференцировки, и обнаружили два статистически значимых изменения: повышение аденилатциклазы 1 и снижение аденилатциклазы 4.

Мы решили оценить вклад аденилатциклазы 1 в остеогенную дифференцировку. Для этого при помощи системы CRISPR/Cas9 D10A был осуществлен нокаут аденилатциклазы 1. Полученная нокаутная линия (AC1 KO) демонстрировала в два раза сниженную экспрессию аденилатциклазы 1. Нокаут значительно нарушил способность клеток к остеогенной дифференцировке. В клетках линии AC1 KO после двух недель с момента индукции остеогенеза не происходит накопления отложений гидроксиапатита кальция, что проявляется в отсутствии окрашивания ализариновым красным. При этом в клетках дикого типа наблюдается нормальный уровень остеогенеза. При оценке уровня экспрессии генов-маркеров остеогенеза в клетках AC1 KO в сравнении с контрольными происходит повышение уровня экспрессии только раннего маркера остеогенеза RUNX2, но не позднего (Osteocalcin).

Мы оценили ответ нокаутной линии клеток на паратиреоидный гормон. Было обнаружено, что в нокаутной линии клеток AC1 KO не наблюдался проостеогенный эффект паратиреоидного гормона. Также нокаут аденилатциклазы 1 изменил характер кальциевого ответа клеток. Нокаут привел к уменьшению количества клеток, отвечающих плавным ответом, и увеличению клеток, отвечающих осцилляциями, что соответствует переключению с проостеогенного аденилатциклазного на фосфолипазный путь.

Таким образом, нами было установлено, что аденилатциклаза 1 является не только ключевым звеном дифференцировки МСК, но также опосредует простеогенное действие паратиреоидного гормона.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда «Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека» (Проект № 19-75-30007).

Список литературы

1. Kulebyakin K., Tyurin-Kuzmin P., Sozaeva L., et al. Dynamic balance between pth1r-dependent signal cascades determines its pro-or anti-osteogenic effects on MSC // *Cells*. 2022. Vol. 11, N 21. doi: 10.3390/cells11213519
2. Hanoune J., Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2001. Vol. 41. P. 145–174. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.41.1.145

Усупжанова Д.Ю.¹ ✉, Астрелина Т.А.¹, Кобзева И.В.¹, Сучкова Ю.Б.¹, Маливанова Т.Ф.¹, Булычева Ю.И.¹, Брунчуков В.А.¹, Никитина В.А.¹, Михадаркина О.Г.¹, Цимахович А.О.², Серова О.Ф.², Самойлов А.С.¹

Оптимизация свойств гидрогеля из внеклеточного матрикса тканей человека для задач регенеративной персонифицированной медицины

¹ ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

² ГБУЗ МО Московский областной перинатальный центр, Балашиха, Россия

✉ usupzhanova94@mail.ru

Аннотация. Гидрогели из внеклеточного матрикса тканей обладают высоким регенеративным потенциалом, основной недостаток — механические свойства. В представленной работе усовершенствована технология получения гидрогеля из ВКМ плаценты человека, а также предложен способ его модификации для задач 3D-биопринтинга.

Ключевые слова: гидрогель; внеклеточный матрикс; химическая сшивка; биосовместимость; 3D-биопринтинг; персонифицированная регенеративная медицина.

Usupzhanova D.Yu.¹, Astrelina T.A.¹, Kobzeva I.V.¹, Suchkova Yu.B.¹, Malivanova T.F.¹, Bulycheva Yu.I.¹, Brunchukov V.A.¹, Nikitina V.A.¹, Mikhadarkina O.G.¹, Tsimakhovich A.O.², Serova O.F.², Samoilov A.S.¹

Optimization of the hydrogel properties from the extracellular matrix of human tissues for the tasks of regenerative personalized medicine

¹ State Research Center — Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency (SRC — FMBC), Moscow, Russia

² Moscow Regional Perinatal Center, Balashikha, Moscow Region, Russia

Abstract. The hydrogels from the extracellular matrix of tissues have a high regenerative potential, the main disadvantage is mechanical properties. In the presented work, the technology of obtaining hydrogel from human placenta ECM was improved, as well as a method of its modification for 3D bioprinting tasks was proposed.

Keywords: hydrogel; extracellular matrix; chemical crosslinking; biocompatibility; 3D-bioprinting; personalized regenerative medicine.

Сегодня гидрогели находят свое применение во многих областях, в частности медицинской практике. Они могут быть представлены в виде инъекционных форм и раневых покрытий, а также получены как из искусственного, так и из натурального сырья [1]. Среди средств лечения поражений различного генеза особое место занимают препараты гидрогелей на основе коллагена, поскольку он является основным компонентом соединительной ткани и способен выступить матрицей для адгезии клеток-резидентов. Также немаловажными являются поддержка клеточного гомеостаза, про- и противовоспалительная регуляция микроокружения в пораженной зоне. В этой связи гидрогели из внеклеточного матрикса (ВКМ) тканей человека представляются одними из наиболее перспективных средств лечения, поскольку, помимо коллагенов различных типов, обогащены ростовыми факторами, а также такими компонентами соединительной ткани, как глюкозаминогликаны, ламинин, фибронектин и эластин. Таким образом, гидрогели из ВКМ способствуют регенерации повреждения, оказывая влияние на течение воспалительного процесса, а также обеспечивая временную индуктивную нишу для адгезии и пролиферации клеток. Помимо этого подобные гидрогели

отличаются превосходной биосовместимостью [2]. Основными недостатками гидрогелей из ВКМ тканей являются их механические свойства — неспособность держать заданную форму, а также ограниченный доступ к биоматериалу человека для их изготовления (инвазивность забора материала, ограничения законодательной базы). В этой связи ткани плаценты человека представляются наиболее удобным источником ВКМ для изготовления гидрогелей на их основе. Одним из направлений оптимизации механических свойств гидрогелей из ВКМ является их модификация методом химической сшивки.

В представленном исследовании была воспроизведена и усовершенствована многостадийная технология получения гидрогеля из ВКМ плаценты человека, в частности этапы децеллюляризации тканей и солюбилизации лиофилизата, а также предложен способ его модификации методом химической биосовместимой сшивки генипином (GNP: 0,2; 0,5; 1 и 2 мМ). Проведенные спектрофотометрические (580 нм, BioTek Cytation 5) и реологические (DMA MCR 702 MultiDrive Anton Paar, Австрия) исследования показателей жесткости (модулей упругости и потерь), пластичности (предел деформации) и времени желатинизации показали, что наиболее оптимальная концентрация сшивающего агента GNP в препарате гидрогеля (15 мг лиофилизата / мл) — 0,2 мМ. Исследования по оценке биосовместимости химически модифицированного гидрогеля ВКМ *in vitro* на модели мезенхимальных стромальных клеток десны человека продемонстрировали их пролонгированное (до 7 дней) выживание и функциональную активность (Live-Dead, Invitrogen). Таким образом, гидрогель из ВКМ плаценты человека, полученный по усовершенствованной технологии и модифицированный методом химической сшивки GNP, демонстрирует удовлетворительные механические свойства, а также биосовместимость *in vitro* и выступает перспективным материалом для создания персонализированных форм с высоким регенеративным потенциалом методом 3D-биопринтинга.

Список литературы

1. Correa S., Grosskopf A.K., Lopez Hernandez H., et al. Translational applications of hydrogels // Chem Rev. 2021. Vol. 121, N 18. P. 11385–11457. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c01177
2. Zhang W., Du A., Liu S., et al. Research progress in decellularized extracellular matrix-derived hydrogels // Regen Ther. 2021. Vol. 18. P. 88–96. doi: 10.1016/j.reth.2021.04.002

Ушаков Р.Е.¹ ✉, Ратушный А.Ю.², Буравкова Л.Б.², Бурова Е.Б.¹

Децеллюляризованный внеклеточный матрикс усиливает паракринную функцию мезенхимных стромальных/стволовых клеток и улучшает их терапевтические свойства

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

✉ uszakow@yandex.ru

Аннотация. Мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) значительно увеличивают экспрессию целого ряда цитокинов, хемокинов, ростовых факторов и микроРНК при культивировании надецеллюляризованном внеклеточном матриксе. Инъекции секретомы МСК ускоряют восстановление мышечной ткани в мышечной модели некроза.

Ключевые слова: децеллюляризованный внеклеточный матрикс; мезенхимные стромальные/стволовые клетки; секретомы; миокины; микроРНК; бесклеточная терапия; некроз мышц.

Ushakov R.E.¹, Ratushnyy A.Yu.², Buravkova L.B.², Burova E.B.¹

Decellularized extracellular matrix enhances the mesenchymal stromal/stem cells paracrine function and improves their therapeutic properties

¹ Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Biomedical Problems, Moscow, Russia

Abstract. Mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) cultured on decellularized extracellular matrix had manifold upregulated expression of a number of cytokines, chemokines, growth factors and microRNAs. Injections of MSCs secretome promoted muscle repair in murine necrosis model.

Keywords: decellularized extracellular matrix; mesenchymal stromal/stem cells; secretome; myokines; microRNA; cell-free therapy; muscle necrosis.

Мезенхимные стромальные/стволовые клетки (МСК) уже несколько десятилетий являются объектом повышенного интереса исследователей благодаря способности оказывать терапевтическое действие в отношении широкого ряда заболеваний и патологических состояний. Терапевтический потенциал МСК связывают, главным образом, с плеiotропными свойствами их секретомы, который включает в себя множество компонентов — цитокинов и хемокинов, ростовых факторов, протеиназ, внеклеточных везикул и микроРНК. Одним из направлений биологии МСК является поиск способов стимулировать продукцию тех или иных компонентов секретомы (прекондиционирование) в целях повышения эффективности терапевтического использования МСК. Мы предположили, что культивирование МСК на децеллюляризованном внеклеточном матриксе (дВКМ), обеспечивающем более физиологически релевантное микроокружение и специфические сигналы для интегриновых рецепторов по сравнению с рутинно используемым культуральным пластиком, может оказывать влияние на секреторную активность МСК. В работе использовали МСК человека различного происхождения: десквамированного эндометрия менструальной крови, пульпы зуба, фетального костного мозга и вартонова студня пупочного канатика. Для получения дВКМ использовали МСК вартонова студня. С помощью коллагеновой зимографии, ОТ-ПЦР в реальном времени и мультиплексного иммуноанализа компонентов секретомы мы обнаружили значительное увеличение экспрессии (вплоть до трёх порядков)

матриксной металлопротеиназы MMP-1, ростовых факторов HGF и FGF-2, цитокинов и хемокинов GRO-а, GRO-b, CXCL5, CXCL6, IL-6, IL-8, G-CSF, GM-CSF и MCP-1 при культивировании МСК на дВКМ по сравнению с пластиком. С помощью NGS-секвенирования было выявлено значительное увеличение экспрессии (до 250 раз) микроРНК miR-146a и miR-147b в МСК, культивируемых на дВКМ. Чтобы оценить, как изменяются свойства кондиционной среды МСК при культивировании на дВКМ (КС-дВКМ), был проведён ряд *in vitro* тестов: КС-дВКМ существенно стимулировала заживление раны на модели фибробластов 3Т3 и кератиноцитов HaCaT, усиливала хемотаксис моноцитов THP-1 и способствовала образованию капилляроподобных структур клетками эндотелия пупочной вены (HUVEC). Мы обратили внимание на то, что ряд апрегулированных паракринных факторов, таких как FGF-2, HGF, G-CSF, IL-6, IL-8, MCP-1, относятся к миокинам — цитокинам, выделяемым скелетными мышцами при сокращении и принимающим участие в регенерации мышечных волокон [1]. Учитывая это обстоятельство, а также данные литературы, согласно которым апрегулированная miR-146a стимулирует пролиферацию миобластов [2], для дальнейшей валидации полученных результатов *in vivo* мы использовали мышиную модель острого некроза скелетных мышц, индуцированного хлористым барием. Как показал гистологический анализ, в группе мышей, получавших инъекции концентрата КС-дВКМ, по сравнению с контрольными группами, на десятые сутки после индукции некроза была существенно большая медианная площадь поперечного сечения регенерирующих мышечных волокон и наблюдалась более высокая васкуляризация. Очевидно, культивирование на дВКМ, значительно стимулирующее секрецию МСК целого ряда паракринных факторов, приводит к функциональным изменениям в кондиционной среде. Мы обнаружили также, что через 8 часов после посева клеток на дВКМ происходит активация киназы MAPKAPK2 и транскрипционного фактора NF-κB, которые могут быть медиаторами паракринного ответа МСК на дВКМ; через 48 часов наблюдается существенное снижение уровня фосфорилирования киназы фокальной адгезии (ФАК), одного из ключевых регуляторов в передаче сигналов от внеклеточного матрикса через интегриновые рецепторы. Обработка клеток химическим ингибитором ФАК, PF-562271, дополнительно усилила дВКМ-индуцированный паракринный ответ МСК. Таким образом, ингибирование ФАК в комбинации с культивированием на дВКМ может рассматриваться как новый способ прекондиционирования МСК. Полученные данные свидетельствуют о том, что культивирование на дВКМ может использоваться для улучшения терапевтических свойств МСК.

Работа поддержана грантом РФФИ № 24-24-00324. Использованные в работе клетки были получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-683).

Список литературы

1. Waldemer-Streyer R.J., Kim D., Chen J. Muscle cell-derived cytokines in skeletal muscle regeneration // FEBS J. 2022. Vol. 289, N 21. P. 6463–6483. doi: 10.1111/febs.16372
2. Kuang W., Tan J., Duan Y., et al. Cyclic stretch induced miR-146a upregulation delays C2C12 myogenic differentiation through inhibition of Numb // Biochem Biophys Res Commun. 2009. Vol. 378, N 2. P. 259–263. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.11.041

Фазуллин М.Ш. ✉, Караманян О.В., Ким С.С., Муллина Р.Р., Бекмухамедова Э.Э.,
Таргачев С.С., Шевченко Р.В., Маркосян В.А.

Экспрессия трансгена в иммунокомпетентных органах мини-свиней после прямой и клеточно-опосредованной доставки с помощью химерного аденовирусного вектора

Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

✉ marat17_fazullin@mail.ru

Аннотация. Использование аутологичных лейкоцитов для клеточно-опосредованной доставки аденовирусных векторов Ad5/F35-GFP минимизирует иммунные реакции и токсичность. Исследование на мини-свиньях показало селективную экспрессию GFP в иммунных органах без изменений в паренхиматозных органах.

Ключевые слова: генная терапия; аденовирусный вектор; мини-свиньи; аутологичный лейкоконцентрат; биологическая безопасность.

Fazullin M.Sh., Karamanyan O.V., Kim S.S., Mullina R.R., Bekmukhamedova E.E., Targachev S.S.,
Shevchenko R.V., Markosyan V.A.

Transgene expression in immunocompetent organs of mini-pigs after direct and cell-mediated delivery using a chimeric adenovirus vector

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract. The study analyzed the distribution of Ad5/35-GFP and migration of transduced leukocytes in mini-pigs. GFP expression was found in immunocompetent organs, except parenchymal organs. The findings support targeted vector distribution and the use of mini-pigs to study gene therapy.

Keywords: gene therapy; adenovirus vector; mini-pigs; autologous leukoconcentrate; biological safety.

Генная терапия с использованием аденовирусных векторов представляет собой перспективный подход для временной экспрессии терапевтических генов. Прямое введение аденовирусных векторов сопряжено с рисками иммунных реакций и токсичностью, что ограничивает их применение в клинической практике. Использование лейкоцитов в качестве клеточных носителей генных конструкций (клеточно-опосредованная доставка) может помочь минимизировать эти риски. Ранее нами был разработан инновационный подход генной терапии, который основан на использовании аутологичного лейкоконцентрата, обогащенного генетическим материалом, который получают путем трансдукции химерным аденовирусным вектором, состоящим из аденовируса 5-го серотипа с фибром аденовируса 35-го серотипа (Ad5/F35).

Цель исследования — анализ распределения химерного аденовирусного вектора, несущего репортерный ген зеленого флуоресцентного белка GFP (Ad5/35-GFP) и миграции аутологичных лейкоцитов, трансдуцированных Ad5/35-GFP, после прямой и клеточно-опосредованной внутривенной инфузии мини-свиньям соответственно.

Исследование выполнено на вьетнамских вислобрюхих мини-свиньях весом 25–30 кг, которые были разделены на две группы в зависимости от способа доставки Ad5/35-GFP: прямая доставка вектора ($n = 3$) и клеточно-опосредованная доставка ($n = 3$). Первой группе 3×10^{10} БОЕ вирусного вектора Ad5/35-GFP вводили внутривенно в ушную вену. Второй группе внутривенно вводили аутологичный лейкоконцентрат, трансдуцированный Ad5/35-GFP при MOI (множественность инфекции) = 10. Забор иммунокомпетентных

органов (селезенка, тимус, поднижнечелюстные лимфоузлы, костный мозг), а также других паренхиматозных органов (сердце, легкие, печень и почки) проводили через 7 суток после введения Ad5/F35-GFP. Для оценки экспрессии GFP в органах-мишенях готовили криостатные срезы, которые исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss). Морфологический анализ тканей проводился на приготовленных парафиновых срезах, окрашенных гематоксилином и эозином.

Флуоресцентная микроскопия продемонстрировала присутствие GFP-позитивных клеток в исследованных иммунокомпетентных органах мини-свиней в обеих группах. При этом в сердце, легких, печени и почках специфическая зеленая флуоресценция, характерная для GFP, не обнаружена. Патоморфологическое исследование выявило лишь умеренные изменения в лимфатических узлах, такие как паракортикальная гиперплазия и синусовый гистиоцитоз, в обеих экспериментальных группах.

Таким образом, можно сделать предварительный вывод о селективном распределении химерного аденовирусного вектора в иммунокомпетентных органах как при прямой доставке, так и с помощью аутологичных лейкоцитов. Полученные данные подтверждают наши молекулярные исследования *in vitro* об иммунной толерантности мини-свиней к данной векторной системе и дают основание полагать о целесообразности использования мини-свиней как модельных животных для исследования эффективности генной терапии с минимальными побочными эффектами, обусловленными векторной системой.

Файзуллин А.Л. ✉, Иванова Е.И., Сержникова Н.Б., Тимашев П.С.

Топография поверхности PLA имплантата определяет исход тканевого ответа

Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ fayzullin_a_l@staff.sechenov.ru

Аннотация. Поверхностная топография полилактидных имплантатов играет ключевую роль в исходе реакции на инородное тело. Имплантаты из крупных гранул со слабовыраженной текстурой поверхности вызвали наименьший воспалительный ответ, что предотвращало формирование зрелой фиброзной капсулы.

Ключевые слова: микротекстурированные имплантаты; имплантат; полилактид; реакция на инородное тело; фиброз; периимплантный фиброз; периимплантная капсула; коллаген.

Fayzullin A.L., Ivanova E.I., Serejnikova N.B., Timashev P.S.

Topography of PLA implants defines the outcome of tissue reaction

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. The surface topography of polylactide implants plays a key role in the outcome of the foreign body reaction. Implants made of large granules with a fine surface texture caused the least inflammatory response, which prevented the formation of a mature fibrous capsule.

Keywords: microtextured implants; implant; polylactide; foreign body reaction; fibrosis; peri-implant fibrosis; peri-implant capsule; collagen.

Топография поверхности полилактидных (PLA) имплантатов оказывает значительное влияние на исход реакции организма на инородное тело. Введение имплантатов неизбежно вызывает иммунные и фибротические реакции, которые могут как способствовать успешной интеграции материала в ткани, так и приводить к осложнениям, включая контрактуру соединительнотканной капсулы. Важно понимать, что особенности поверхности имплантата, которые можно задать с помощью размера и формы образующих его гранул, играют ключевую роль в развитии этих процессов.

Исследование было посвящено изучению влияния топографии поверхности на воспалительные и фибротические реакции и было проведено на модели ушных карманов кроликов породы шиншилла. Были созданы три типа имплантатов с различной поверхностной топографией, основанной на размерах гранул PLA: крупные (100–200 мкм), средние (56–100 мкм) и мелкие (1–56 мкм). Имплантаты были помещены в подкожные карманы в ушах кроликов, после чего проводился анализ реакций тканей в различные временные периоды: на 7-й, 14-й, 30-й и 60-й дни.

Результаты исследования продемонстрировали, что имплантаты с крупными гранулами вызвали менее выраженный воспалительный процесс и замедленное образование фиброзной капсулы по сравнению с имплантатами из мелких и средних гранул. В первые две недели после имплантации вокруг всех типов имплантатов наблюдались выраженные воспалительные процессы, сопровождавшиеся отеком тканей и развитием грануляционной ткани с высоким уровнем васкуляризации. Однако к 30-му дню в случае имплантатов с крупными гранулами интенсивность воспаления значительно снижалась, что сопровождалось меньшей выраженностью фибротических изменений.

Имплантаты из мелких и средних гранул вызвали более выраженную реакцию со стороны иммунной системы, что приводило к более быстрому формированию фиброзной капсулы. Эта капсула, состоящая

из плотных пучков коллагеновых волокон, образовывалась вокруг имплантатов, создавая барьер между инородным телом и окружающими тканями. Однако в случае имплантатов из крупных гранул формирование фиброзной капсулы происходило медленнее, а сама капсула была менее плотной и зрелой. На 60-й день вокруг имплантатов из крупных гранул отмечалась слабая инфильтрация макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородных тел, тогда как вокруг имплантатов из мелких и средних гранул сохранялся высокий уровень воспаления и активной пролиферации фибробластов.

Анализ данных показал, что различия в реакциях тканей на имплантаты разных типов можно объяснить не только размером гранул, но и связанными с ним физическими характеристиками поверхности, такими как гидрофильность, пористость и жесткость. Эти характеристики напрямую влияют на процессы ангиогенеза, воспаления и фиброза, определяя конечный исход имплантации. Имплантаты с более крупными гранулами создают условия для менее выраженной иммунной реакции, что снижает риск образования плотной фиброзной капсулы, которая может стать причиной контрактуры капсулы.

Настоящее исследование подчеркивает важность выбора правильной топографии поверхности имплантатов для минимизации риска осложнений и улучшения их интеграции с тканями организма. Имплантаты с крупными гранулами представляются более предпочтительными для использования в клинической практике, так как они способствуют снижению выраженности воспалительных и фибротических реакций, что в конечном итоге может повысить успешность их применения в регенеративной медицине.

Файзуллин А.Л. ✉

Научное наследие профессора А.Б. Шехтера в регенеративной медицине

Институт регенеративной медицины, Сеченовский Университет, Москва, Россия

✉ fayzullin_a_l@staff.sechenov.ru

Аннотация. Профессор А.Б. Шехтер был выдающимся ученым, внесшим неоценимый вклад в развитие регенеративной медицины и коллагенопластики. Его научные достижения и разработки помогли тысячам пациентов получить эффективное лечение.

Ключевые слова: регенеративная медицина; коллагенопластика; коллаген.

Fayzullin A.L.

Scientific heritage of professor A.B. Shekhter in regenerative medicine

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. Professor A.B. Shekhter was an outstanding scientist who made an invaluable contribution to the development of regenerative medicine and collagenoplasty. His scientific achievements and developments helped thousands of patients receive effective treatment.

Keywords: regenerative medicine; collagenoplasty; collagen.

Профессор Анатолий Борухович Шехтер является выдающимся отечественным исследователем соединительной ткани в норме и при патологии, автором теории соединительной ткани как интегративной функциональной системы, а также одним из основоположников коллагенопластики в медицине. Его монография «Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология)» стала настольной книгой нескольких поколений патологоанатомов и ученых.

Научные исследования Анатолия Боруховича определили появление и развитие направлений лечения газообразным экзогенным оксидом азота («NO-терапия») и лазерной инженерии хряща. Он выступал ведущим экспертом-патоморфологом в разработке широкого спектра инновационных имплантируемых биоматериалов, предназначенных для использования в реконструктивной хирургии. За создание новых материалов для тканеинженерной реконструкции сердца Анатолий Борухович получил премию Правительства Российской Федерации в области науки и техники. Профессор Шехтер внес существенный вклад в исследование рубцовых процессов и детализировал морфогенез прогрессирующей дезорганизации соединительной ткани при системных заболеваниях соединительной ткани с иммунными нарушениями. В последние годы профессор Шехтер успешно возглавлял фундаментальные и прикладные биомедицинские проекты. Центральным фокусом его исследований стали механизмы тканевой реакции на имплантаты. Эти работы позволили транслировать исследования тканевой регенерации в клинику.

Анатолий Борухович был вдумчивым и ответственным патологом, всегда стремившимся к максимальной точности в биопсийной диагностике. Авторитет Анатолия Боруховича в диагностике заболеваний суставов, раневых и рубцовых процессов был исключительно высок. Но еще более важно то, что за каждым исследованным образцом ткани он видел пациента и совместно с клиницистами старался найти наилучшие пути лечения.

Анатолий Борухович был, без преувеличения, гениальным ученым — генератором принципиально новых идей, и талантливым педагогом. Он внес значительный вклад в научное сообщество, будучи автором более

чем 400 научных работ, 6 монографий и 40 патентов. Его открытия и идеи легли в основу нескольких медицинских технологий, благодаря которым многие тысячи пациентов получили современное, эффективное лечение. Под руководством и при консультации Анатолия Боруховича было защищено более 26 кандидатских и 8 докторских диссертаций.

Анатолий Борухович был всегда бесконечно предан своему делу и беспощаден к любой недобросовестности в науке, обладал исключительным трудолюбием и жизнелюбием. Всегда спокойный, мудрый, проницательный, доброжелательный и готовый помочь каждому, он объединял вокруг себя очень многих и пользовался огромной любовью и уважением коллег и друзей. Анатолий Борухович до самого конца оставался активным ученым, который был окружён коллегами и учениками в ежедневном научном общении, любовью друзей всех возрастов, родных, внуков.

Фатыхов И.Р.¹ ✉, Кошеверова В.В.¹, Каменцева Р.С.¹, Харченко М.В.¹, Котов М.А.^{1,2},
Кунеев И.К.¹, Корнилова Е.С.^{1,3}

ЭФР и ТФР-а препятствуют децидуализации эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, но не амфирегулин

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

✉ fatykhov@gmail.com

Аннотация. При децидуализации эндометриальных мезенхимных стволовых клеток лиганды рецептора эпидермального фактора роста EGF и ТФР-а не влияют на экспрессию генов маркеров дифференцировки IGFBP1 и PRL, но отменяют секрецию клетками IGFBP1 на уровне белка. Децидуализация вызывает изменение уровня EGFR.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; рецептор ЭФР; децидуализация; ПЦР; вестерн-блот.

Fatykhov I.R.¹, Kosheverova V.V.¹, Kamentseva R.S.¹, Kharchenko M.V.¹, Kotov M.A.^{1,2},
Kuneev I.K.¹, Kornilova E.S.^{1,3}

EGF, TGF- α prevent decidualization of human endometrial stem cells, but not ampiregulin

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

³ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. During decidualization of endometrial mesenchymal stem cells, the epidermal growth factor receptor ligands EGF and TGF- α do not affect the expression of the differentiation marker genes IGFBP1 and PRL, but abolishes the cells' secretion of IGFBP1. Decidualization causes changes in EGFR levels.

Keywords: mesenchymal stem cells; EGF receptor; decidualization; PCR; western-blot.

В эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (энМСК) наблюдается высокий уровень экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (рЭФР). При этом при воздействии таких лигандов, как эпидермальный фактор роста (ЭФР) и трансформирующий фактор роста- α (ТФР- α), происходит длительное и значительное снижение уровня рецептора в клетках в результате эндоцитоза и лизосомной деградации рецептора. Амфирегулин при этом не интернализуется и не влияет на уровень рЭФР в этих клетках. ЭнМСК обладают высоким потенциалом дифференцировки. Их особенностью является тканеспецифичная децидуальная дифференцировка, необходимая для имплантации эмбриона. Хорошо известно, что ЭФР-рецепторная система участвует в процессе имплантации [1], однако данные о роли рЭФР в децидуализации противоречивы. Поэтому целью нашей работы был анализ влияния ЭФР, ТФР- α и AP на стимулированную 8-Br-cAMP и прогестероном децидуальную дифференцировку энМСК. Оценка происходила по уровню экспрессии маркеров децидуальной дифференцировки: пролактина и IGFBP1 (белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста 1) методом ПЦР и оценка уровня соответствующих белков методом вестерн-блот. Также оценивался уровень экспрессии генов EGFR и HER2 в процессе дифференцировки. Работа выполнена на культуре клеток энМСК линии 2804, воздействие лигандов и дифференцировочной среды происходило 5 суток. По результатам эксперимента клетки под воздействием дифференцировочной среды показали высокий уровень экспрессии пролактина и IGFBP1, что подтверждает успешность децидуализации. Оказалось,

что инкубация клеток с ЭФР, ТФР-а и АР не привела к изменению экспрессии маркеров децидуализации на уровне РНК, но ЭФР и ТФР-а вызывали уменьшение количества IGFBP1 на уровне белка. Экспрессия рецептора EGFR была заметно снижена в децидуализированных клетках. Экспрессия рецептора HER2 не изменялась ни при децидуализации, ни при действии лигандов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что рецептор-опосредуемые сигнальные пути, стимулируемые АР, ЭФР и ТФР-а, не оказывают влияние на децидуализацию на уровне РНК. Однако также показано, что секреция IGFBP1 существенно снижается при добавлении ЭФР и ТФР-а в дифференцировочную среду, таким образом, регуляция секреции маркера дифференцировки IGFBP1 регулируется отличным от подавления экспрессии этого белка образом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-14-00335).

Список литературы

1. Kamentseva R.S., Kharchenko M.V., Gabdrahmanova G.V., et al. EGF, TGF- α and Amphiregulin differently regulate endometrium-derived mesenchymal stromal/stem cells // *Int J Mol Sci.* 2023. Vol. 24, N 17. doi: 10.3390/ijms241713408

Федорова Е.А.¹✉, Рыжов А.П.², Кнотько А.В.², Фадеева И.В.¹, Антонова О.С.¹, Селезнева И.И.³

Матрицы в регенеративной медицине на основе пористой керамики из двойных замещенных гидроксиапатитов, допированных ионами марганца и стронция

¹ Институт металлургии и материаловедения имени А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

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

³ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская область, Россия

✉ fedorova_katycha@mail.ru

Аннотация. Твердофазным синтезом получены порошки (стронций и марганец)-замещенных гидроксиапатитов. Все соединения охарактеризованы РФА, ИК-спектроскопией. Исследования *in vitro* показали, что керамика из замещенных ГА является биосовместимой и перспективной в качестве матриц в регенеративной медицине.

Ключевые слова: марганец; стронций; гидроксиапатит; свойства поверхности; клеточная пролиферация; матрицы.

Fedorova E.A.¹, Ryzhov A.P.², Knot'ko A.V.², Fadeeva I.V.¹, Antonova O.S.¹, Selezneva I.I.³

Porous ceramics from manganese and strontium substituted hydroxyapatites as matrixes for regenerative medicine

¹ A.A. Baikov IMET RAS, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

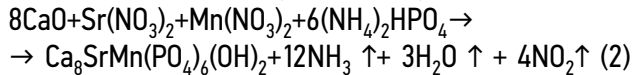
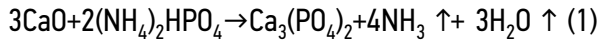
³ ITEB RAS Puschino, Moscow region, Russia

Abstract. Powders (strontium and manganese) of substituted hydroxyapatites were obtained by solid-phase synthesis. All compounds were characterized by XRD and IR spectroscopy. *In vitro* studies have shown that ceramics made of substituted HA are biocompatible and promising as matrixes in regenerative medicine.

Keywords: manganese; strontium; hydroxyapatite; surface matrix properties; cell proliferation; matrixes.

Фосфаты кальция, в частности гидроксиапатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ГА), являются основным минеральным компонентом костной ткани. Поэтому ГА является биосовместимым с тканями организма. Однако недостатком ГА, затрудняющим его применение в регенеративной медицине, является его крайне низкая биорезорбируемость. При проведении катионных и анионных замещений в структуре ГА в решетке последнего возникают напряжения, результатом чего является увеличение биорезорбции. Интерес к замещенным гидроксиапатитам ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, ГА) связан с их потенциальными возможностями для применения в качестве матриц для восстановления поврежденных костных тканей. Введение допантов, кроме того, способствует появлению у ГА новых полезных свойств, как антибактериальная активность, при введении катионов с антибактериальными свойствами. Благодаря введению марганца в состав ГА последний приобретает antimicrobial свойства [1]. Катион стронция, Sr^{2+} , как было показано ранее в [2], улучшает клеточную пролиферацию. Присоединение мезенхимальных стволовых клеток (МСК) к линии остеобластов является необходимым условием для реконструкции костной ткани. Ионы стронция могут способствовать закреплению стволовых клеток в линии остеобластов, стимулируя экспрессию остеогенных фенотипических маркеров и усиливая формирование кости. При содопировании ГА одновременно двумя ионами, как было показано в [2], наблюдается эффект взаимного влияния допантов с усилением антибактериальной активности.

Целью настоящей работы являлись синтез со-допированных (марганец и стронций)-содержащих гидроксиапатитов и пористой керамики из них, установление влияния одновременного замещения части ионов кальция на ионы марганца и стронция на биологическую совместимость полученных керамик. Порошки ГА, допированные ионами Mn^{2+} , Sr^{2+} ((Mn,Sr)ГА), были синтезированы твердофазным методом согласно реакциям (1 и 2):



Количество допантов в (Mn,Sr)ГА, согласно элементному анализу, соответствует введенному при синтезе. Основной кристаллической фазой, по данным РФА, является апатит, в качестве примесной фазы присутствует витлокит, не более 5% масс. Керамику в виде дисков диаметром 5 мм получали прессованием при общем давлении прессования 1000 кгс с последующим спеканием в камерной печи с силитовыми нагревателями при температуре 1200°C. Усадка образцов составила порядка 10 и 15% для ТКФ и (Mn,Sr)ГА, соответственно. Микроструктура керамики однородная с присутствием пор размером от 1 до 5 мкм.

Клетки пульпы зуба человека (DPSC) выделяли из зачатка третьего моляра, извлеченного по ортодонтическим показаниям по методике, описанной ранее в [3]. Для проведения исследований использовали клетки на 3–4-м пассаже.

Для изучения адгезивных характеристик материалов и определения их способности поддерживать пролиферативную активность клеток проводили посев DPSC на поверхность исследуемых материалов в концентрации 40 тыс. кл/см² (среда DMEM/F12 + 10% FBS). В качестве контроля использовались покровные стекла. После окончания культивирования на 1, 3 и 7-е сутки проводили оценку морфологии и жизнеспособности клеток, культивируемых на поверхности исследуемых материалов, с использованием флуоресцентного микроскопа Axiovert 200. Для проведения анализа использовали метод флуоресцентного окрашивания клеток SYTO 9 и иодидом пропидия.

Таким образом, твердофазным синтезом получены (марганец и стронций)-содержащие ГА и керамика из них. На основании *in vitro* исследований установлено, что керамика является биосовместимой и перспективна для использования в качестве матриксов в регенеративной медицине.

Синтез и получение керамики выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и образования, грант № 075-00320-24-01.

Биоиспытания образцов *in vitro* выполнены в рамках ГЗ № 075-00224-24-01.

Список литературы

1. Kanchana P., Sekar C. Influence of manganese on the *in vitro* biocompatible and antibacterial properties of nanostructured hydroxyapatite // Materials Focus. 2018. Vol. 7, N 4. P. 464–472.
2. Ni G.X., Yao Z.P., Huang G.T., et al. The effect of strontium incorporation in hydroxyapatite on osteoblasts *in vitro* // J Mater Sci Mater Med. 2011. Vol. 22, N 2. P. 961–967. doi: 10.1007/s10856-011-4264-0
3. Poltavtseva R.A., Pavlovich S.V., Klimantsev I.V., et al. Mesenchymal stem cells from human dental pulp: isolation, characteristics, and potencies of targeted differentiation // Bull Exp Biol Med. 2014. Vol. 158. P. 164–169. doi: 10.1007/s10517-014-2714-7

Федоров В.С.^{1–3} ✉, Колесниченко Ю.В.¹, Лихоманова Р.Б.^{1,2}, Юдинцева Н.М.^{1,2}, Оганесян Е.А.^{1,2},
Нечаева А.С.², Аксенов Н.Д.¹, Зиганшин Р.Х.⁴, Шевцов М.А.^{1,2,5}

Организация интерактома HSP70 в стволовых клетках мультиформной глиобластомы

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² НМИЦ им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

³ СПбГУВМ, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

⁵ Клиника rechts der Isar, Технический Университет Мюнхена, Мюнхен, Германия

✉ fedorovvs.biotech@gmail.com

Аннотация. Клетки опухолей ЦНС отличаются инвазивным потенциалом, процессы которого опосредуются молекулярным окружением белков теплового шока (HSP). Данное исследование показало, что клетки опухолей головного мозга обладают стволовостью, а HSP образует необходимую для поддержания процессов миграции и инвазии белковую сеть.

Ключевые слова: молекулярные шапероны; Hsp70; интерактом; мультиформная глиобластома; опухолевые стволовые клетки.

Fedorov V.S.^{1–3}, Kolesnichenko Yu.V.¹, Likhomanova R.B.^{1,2}, Yudincheva N.M.^{1,2}, Oganessian E.A.^{1,2},
Nechaeva A.S.², Aksenov N.D.¹, Ziganshin R.H.⁴, Shevtsov M.A.^{1,2,5}

HSP70 interactome organization in glioblastoma stem cells

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Almazov NMRC, Saint Petersburg, Russia

³ SPbSUVM, Saint Petersburg, Russia

⁴ Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

⁵ Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, Munich, Germany

Abstract. Glioblastoma cells are characterized by highly invasive potential which is mediated by the chaperone activity of heat shock proteins (HSPs). This study showed that tumor cells exhibit stemness, and HSPs form a protein network which supports the processes of migration and invasion.

Keywords: molecular chaperones; Hsp70; interactome; glioblastoma multiforme; cancer stem cells.

Стволовость опухолевых клеток определяет их способность к самообновлению, дифференцировке и взаимодействию с микроокружением. Клетки с высокой степенью стволовости активно участвуют в поддержании прогрессирования рака. Предполагается, что именно такую активность и «пластичное» состояние опосредует гетерогенность, метастазирование и рецидивы злокачественных новообразований [1]. Гетерогенность мультиформной глиобластомы (МГБ) является одним из ключевых факторов сложности диагностики и терапии данного вида злокачественных новообразований ЦНС. В дополнение к стволовости исследователи описывают молекулярные события прогрессии рака, относящиеся к миграции и инвазии [2]. Белки теплового шока (HSP), в частности представители семейств HSP70 и HSP90, вовлечены во многие аспекты опухолевой прогрессии за счет взаимодействий с белками, участвующими в различных ключевых биологических процессах. Данное явление особенно важно в изучении прогрессии различных солидных опухолей, таких как рак молочной железы, легкого, предстательной железы, ЦНС, так как характерная для них гиперэкспрессия HSP70, HSP90 напрямую связана с развитием заболевания. Показано, что HSP70

необходим для опосредования инвазии клеток МГБ с высокой степенью стволовости [3]. Дополнением к классическому исследованию клеточных культур являются построение и анализ белковых сетей (PPI), что особенно важно в изучении патогенеза опухолей ввиду динамичности окружения HSP.

В данном исследовании предлагается способ выделения мембранной формы (mHsp70) интерактома с помощью магнитного наноносителя с последующим биоинформатическим анализом полученных сетей. Образцы интерактома были выделены из лизата клеток первичных культур МГБ, полученных из фрагментов послеоперационного материала взрослых пациентов ($n = 5$) с использованием магнитного осаждения белковых комплексов на наночастицах, функционализированных специфичными антителами к HSP70. С помощью метода проточной цитофлуорометрии была выполнена оценка уровня экспрессии mHSP70 и маркеров стволовых клеток (SOX2, NESTIN, CD133) у клеток МГБ. Протеомный анализ образцов интерактома проводили с помощью метода масс-спектрометрии с последующей обработкой массива идентифицированных белков в программе Cytoscape. Было показано, что полученные в ходе протеомного анализа PPI отражают высокую гетерогенность окружения HSP70: среди образцов найдено 132 общих белка, что в среднем составляет 12% от всего исследуемого протеома. Примечательно, что в полученном консервативном кластере находятся белки, опосредующие миграцию и инвазию — регуляторы актиновых и промежуточных филаментов, аппарат ГТФаз Rab, Ran и Rho. Вместе с этим сохраняется шаперон, включающий такие компоненты, как HSPA1B, HSPA5 и HSP90, которые наряду с GAPDH и ACTB являются центрами организации интерактома. По топологии интерактом mHSP70 МГБ является аналогичным симулированному протеому псевдоподий здоровых клеток. К числу уникальных для разных образцов белков относятся элементы протеостаза и поддержания метаболизма; среди таких белков не было выявлено изученных прогностических маркеров злокачественных новообразований. Полученные результаты предлагают дополнительное обоснование описанным ранее биологическим процессам миграции и инвазии опухолевых клеток, интегрируя представление о динамичности и гетерогенности белковых комплексов при высокой степени стволовости. Выявленные закономерности могут послужить основанием для подбора синергичных ингибиторов в тераностике опухолей ЦНС.

Список литературы

1. Loh J.J., Ma S. Hallmarks of cancer stemness // *Cell Stem Cell*. 2024. Vol. 31, N 5. P. 617–639. doi: 10.1016/j.stem.2024.04.004
2. Kałuzińska-Kołat Ż., Kołat D., Kośła K., et al. Delineating the glioblastoma stemness by genes involved in cytoskeletal rearrangements and metabolic alterations // *World J Stem Cells*. 2023. Vol. 15, N 5. P. 302–322. doi: 10.4252/wjsc.v15.i5.302
3. Shevtsov M., et al. Membrane-bound heat shock protein mHsp70 is required for migration and invasion of brain tumors // *Cancer Res Commun*. 2024. Vol. 4, N 8. P. 2025–2044. doi: 10.1158/2767-9764.CRC-24-0094

Федотов М.А. ✉

Антидиабетическая активность коллоидного раствора селена

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

✉ mikle_fed@mail.ru

Аннотация. Рассмотрен способ получения коллоидных растворов селена методом импульсной лазерной абляции в жидкости. Полученные растворы обладают антидиабетической активностью, которая выражается в снижении уровня глюкозы и гликированного гемоглобина.

Ключевые слова: селен; коллоидный раствор; наночастицы; сахарный диабет; антидиабетическая активность; антиоксидантная защита.

Fedotov M.A.

Antidiabetic activity of colloidal selenium solution

A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. A method for obtaining colloidal solutions of selenium using pulsed laser ablation in a liquid is considered. The resulting solutions have antidiabetic activity, which is expressed in a decrease in the level of glucose and glycated hemoglobin.

Keywords: selenium; colloidal solution; nanoparticles; diabetes mellitus; antidiabetic activity; antioxidant protection.

Сахарный диабет — одно из самых распространённых заболеваний эндокринной системы, связанное с нарушением обмена веществ в организме. По данным ВОЗ, в 2019 году сахарный диабет вошел в десятку основных причин смерти [1]. В России число пациентов с диагностированным сахарным диабетом достигает 3,5%. Одним из основных процессов, вызывающих развитие сахарного диабета, является оксидативный стресс [2]. Соединения селена являются перспективной основой для разработки антидиабетических препаратов [3]. По сравнению с селеном в виде солей (селениты, селенаты и др.) наноразмерные формы селена обладают более выраженными биологическими свойствами при более низкой токсичности. Коллоидный селен обладает также антиоксидантной активностью, что может положительно сказываться на регенерации инсулиноцитов [4].

Метод лазерной абляции в жидкости является перспективным способом получения чистых коллоидных растворов селена для медицинского применения. В качестве мишени используется селен марки ОСЧ. Мишень помещалась на дно стеклянного сосуда, заполненного дистиллированной водой. Облучение мишени проводилось наносекундным импульсным лазерным пучком с длиной волны 1064 нм и энергией 2 Дж. Частота следования импульсов составляла 1 Гц. В результате воздействия лазерного излучения на мишень поверхность материала нагревается сначала до температуры плавления, а далее до температуры испарения. Получающиеся в процессе конденсации частицы образуют коллоидный раствор испаряемого материала. Размер частиц селена в коллоидном растворе варьируется от 50 до 110 нм при среднем размере 85 нм. Дзета-потенциал составляет –35 мВ, что характеризует коллоидный раствор как достаточно устойчивый.

Исследование антидиабетической активности полученного коллоидного раствора селена проводилось на крысах с индуцированным аллоксановым диабетом. Раствор вводился перорально с питьевой водой в концентрации 170 мг/кг живой массы. Результаты показали, что введение наноразмерного селена крысам с аллоксановым диабетом позволяет снизить уровень содержания глюкозы в крови на 15,7% до значения 7,4 ммоль/л, а уровень гликированного гемоглобина — на 17,9% до значения 5,13%. Показатели контрольной

группы при этом составляли 6,9 ммоль/л и 5,5% соответственно. Введение селена также способствовало увеличению площади островкового аппарата поджелудочной железы у крыс на 23,8%. В организме крыс селен проявляет антиоксидантные свойства, что выражается в существенном увеличении восстановленного глутатиона в группе зараженных крыс после введения коллоидного раствора селена.

Таким образом, коллоидные растворы селена являются перспективным материалом для создания противодиабетических средств.

Список литературы

1. Бичурин Д.Р., Цыбусов А.П., Черепанова О.А. Сахарный диабет как проблема регионального здравоохранения // Международный научно-исследовательский журнал. 2024, № 1(139). EDN: FHVDBM doi: 10.23670/IRJ.2024.139.80
2. Giacco F., Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications // *Circ Res*. 2010. Vol. 107, N 9. P. 1058–1070. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223545
3. Kim J., Chung H.S., Choi M.K., et al. Association between serum selenium level and the presence of diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies // *Diabetes Metab J*. 2019. N 43, N 4. P. 447–460. doi: 10.4093/dmj.2018.0123
4. Гетте И.Ф., Федотов М.А., Султанова Т.Р., и др. Экспериментальное исследование антиоксидантного и антидиабетического действия коллоидного раствора наноразмерного селена // *Вестник Уральской медицинской академической науки*. 2022; Т. 19, № 3. С. 193–202. doi: 10.22138/2500-0918-2022-19-3-193-202

Финк М.А.^{1,2}✉, Бобыльков В.А.³, Александрова С.А.², Дарвиш Д.М.^{2,4}

Разработка биоматериала на основе ксеноперикарда с улучшенными механическими свойствами и низкой цитотоксичностью

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, Россия

✉ maksim.fink@pharminnotech.com

Аннотация. Разработан ксеноперикардальный биоматериал. Предложенный метод децеллюляризации и стабилизации ксеноперикарда позволил получить материал, обладающий высокой прочностью и биосовместимостью.

Ключевые слова: ксеноперикард; децеллюляризация; биоматериалы; регенеративная медицина.

Fink M.A.^{1,2}, Bobylkov V.A.³, Alexandrova S.A.², Darvish D.M.^{2,4}

Development of a xenopericardium-based biomaterial with enhanced mechanical properties and biocompatibility

¹ Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ Pavlov First Saint Petersburg State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, Saint Petersburg, Russia

Abstract. A xenopericardial biomaterial has been developed. The proposed method of decellularization and stabilization of the xenopericardium made it possible to obtain a material with high strength and biocompatibility.

Keywords: xenopericardium; decellularization; biomaterials; regenerative medicine.

Ксеноперикард уже давно применяется в кардиохирургии, однако этот материал также имеет потенциал и в регенеративной медицине, где требуется создание биосовместимых каркасов для восстановления поврежденных тканей. Обычные методы обработки перикарда включают применение глутарового альдегида, который может приводить к повышенной цитотоксичности. В нашем исследовании был предложен альтернативный подход — использование карбодиимида для улучшения механических свойств ксеноперикарда. Этот реагент формирует связи нуклеофильного типа и не остается в материале после завершения реакции, что позволяет снизить цитотоксичность и улучшить биосовместимость материала.

Целью исследования являлась разработка биоматериала на основе ксеноперикарда с улучшенными механическими свойствами и низкой цитотоксичностью.

В рамках исследования использовали ксеногенные материалы, такие как свиной и говяжий перикарды. Подготовка ксеноперикардального биоматериала состояла из двух этапов: децеллюляризации и обработки карбодиимидом.

В процессе децеллюляризации образцы перикарда подвергались циклам заморозки и разморозки, что приводило к образованию кристаллов льда внутри клеток и разрыву их мембран. Достигнутое таким образом разрушение клеточных структур облегчало их последующее удаление из ткани. Затем образцы

обрабатывали растворами детергентов: 1% додецилсульфатом и 0.5% дезоксихолатом натрия. Додецилсульфат натрия, благодаря своим амфифильным свойствам, разрушал липидные бислои клеточных мембран и денатурировал белки. Дезоксихолат натрия, являясь мягким детергентом, дополнял этот процесс, обеспечивая удаление липидов и белков, но при этом минимизируя повреждение внеклеточного матрикса. Далее образцы многократно промывали в воде типа I и фосфатно-солевом буфере, чтобы полностью удалить остатки детергентов и других реагентов, которые могут оказывать цитотоксическое действие. Эффективность реализованного процесса децеллюляризации была подтверждена в результате гистологических исследований, в которых для визуализации клеточных элементов применяли окрашивание гематоксилин-эозином и DAPI.

После децеллюляризации перикарда проводили карбодиимидно-иницируемое ковалентное связывание с использованием EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил) карбодиимида) и NHS (N-гидроксисукцимида). Концентрация EDC варьировалась в диапазоне 5–25 мМ. Затем образцы перикарда тщательно промывали в воде типа I и 0.1 М растворе динатрия фосфата для удаления остаточных химических веществ. Этот этап крайне важен для снижения потенциальной цитотоксичности.

Механические испытания полученных образцов были проведены на универсальной установке Instron 1122, где лоскуты перикарда шириной 20 мм подвергали одноосному растяжению со скоростью 20 мм/мин. Результаты испытаний показали, что прочность на разрыв у полученных образцов варьировалась от 7 до 31 МПа, а деформация от 29 до 120%. При этом увеличение количества сшивающего агента не приводило к линейному увеличению разрывного напряжения, среднее значение этого показателя для всех испытанных образцов составило примерно 14–15 МПа. В то же время просматривалась четкая тенденция увеличения жесткости на изгиб с увеличением концентрации сшивающего агента.

Биосовместимость полученных ксеноперикардов была подтверждена в ряде экспериментов. МТТ-тест и прижизненная световая микроскопия показали отсутствие цитотоксического действия на МСК человека кондиционированных сред. А данные, полученные с помощью голомографического микроскопа Tomocube HT-X1 с применением красителя DAPI и просветляющей жидкости, подтвердили адгезию клеток к образцам ксеноперикарда в экспериментах, где клетки культивированы непосредственно на его поверхности. Полученные данные свидетельствуют о высокой биосовместимости полученного материала.

Таким образом, полученный в результате работы ксеноперикард обладает высокими механическими свойствами и биосовместимостью, что делает его весьма перспективным для применения в регенеративной медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках темы государственного задания FMFU-2024-0008.

Фомина Е.Г. ✉, Григорьева Е.Е., Корень С.В., Зверко В.В.

Идентификация культур клеток животного происхождения на основании ДНК-баркодирования участка гена субъединицы 1 цитохром с-оксидазы: алгоритм и результаты применения

НИИ гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии, микробиологии, РЦГЭиОЗ, Минск, Республика Беларусь

✉ feg1@tut.by

Аннотация. На основании секвенирования участка гена цитохромоксидазы C01 подтверждена принадлежность к определённому биологическому виду для 19 из 20 исследованных культур клеток. Доказано происхождение клеточной культуры Ma-104, внесённой в реестр неверно идентифицированных линий, от *Chlorocebus pygerythrus*.

Ключевые слова: культуры клеток животного происхождения; секвенирование; ген субъединицы 1 цитохром-с-оксидазы; ДНК-баркодирование.

Fomina E.G., Grigorieva E.E., Koran S.V., Zverko V.V.

Identification of animal cells through mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (C01) DNA barcodes: algorithm and results obtained

Scientific research institute of hygiene, toxicology, epidemiology, virology and microbiology, RCHEPH, Minsk, Republic of Belarus

Abstract. For 19 out of 20 investigated cell cultures the belonging to a certain biological species was confirmed based on sequencing of the cytochrome c oxidase subunit 1 gene region. The origin of Ma-104 cell culture, included in the register of misidentified lines, from *Chlorocebus pygerythrus* was proved.

Keywords: animal cell cultures; sequencing; cytochrome c oxidase subunit 1 gene; DNA barcoding.

Клеточные культуры находят широкое применение в различных областях биологии и медицины для диагностики инфекционных заболеваний, производства иммунобиологических препаратов и вакцин, контроля качества лекарственных средств, разработки биомедицинских продуктов и технологий, а также проведения научных исследований. В РЦГЭиОЗ на базе лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии функционирует коллекция культур клеток человека и животных, основное назначение которой — регулярное обеспечение научных и практических учреждений республики качественным, надёжно охарактеризованным и безопасным клеточным материалом. Одним из приоритетных направлений развития коллекции является совершенствование системы контроля качества путем разработки и внедрения новых методов исследования, соответствующих мировым стандартам.

Для установления видовой принадлежности клеточных линий животного происхождения применяется ДНК-баркодирование (DNA barcoding) на основании 5'-концевого участка митохондриального гена субъединицы 1 цитохромоксидазы C (C01, cytochrome c oxidase subunit 1). Действующим международным нормативным документом, регламентирующим его проведение, является стандарт ANSI/ATCC ASN-0003-2015 «Species-level identification of animal cells through mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (C01) DNA barcodes», разработанный Американским национальным институтом стандартов (American National Standards Institute, ANSI) вместе с ATCC (American Type Culture Collection) [1].

Из 20 культур коллекционного фонда была выделена ДНК надлежащего качества, с использованием вырожденных праймеров амплифицирован фрагмент гена C01 и определена его нуклеотидная

последовательность в реакции секвенирования по Сенгеру. Анализ полученных результатов показал пригодное для интерпретации и сравнения с референсной базой данных качество электрофореграмм. В соответствии с требованиями стандарта ANSI/ATCC ASN-0003-2015 как минимум 500 нуклеотидов (75%) непосредственно в участке гена CO1 размером ~660 п.н. (после обработки и удаления последовательностей праймеров) должны быть с высоким качеством прочтения, т.е. иметь значение показателя QV (Quality value), отражающего точность определения нуклеотида в каждой позиции, ≥ 30 .

Результаты верификации вида организма, из которого были получены клетки, доказывают соответствие культуры клеток BGM виду *Chlorocebus aethiops* (синоним *Chlorocebus sabaeus*) (африканская зелёная мартышка), McCoу B — виду *Mus musculus* (мышь), Vero — виду *Chlorocebus aethiops* (африканская зелёная мартышка), MDBK — виду *Bos taurus* (бык), СПЭВ — виду *Sus scrofa* (свинья), VeroE6 — виду *Chlorocebus aethiops* (африканская зелёная мартышка), C6 — виду *Rattus norvegicus* (крыса), Vero (V) — виду *Chlorocebus aethiops* (африканская зелёная мартышка), MDCK — виду *Canis lupus familiaris* (собака), Ma-104 — виду *Chlorocebus pygerythrus* (карликовая зелёная мартышка); NFS-60 — виду *Mus musculus* (мышь); L929 — виду *Mus musculus* (мышь); 46–47 — виду *Chlorocebus aethiops* (африканская зелёная мартышка); EL-4 — виду *Mus musculus* (мышь); L1210 — виду *Mus musculus* (мышь); P388D1 — виду *Mus musculus* (мышь); P3X63Ag8.653 — виду *Mus musculus* (мышь); RK-13 — виду *Oryctolagus cuniculus* (кролик); CV-1 — виду *Chlorocebus aethiops* (африканская зелёная мартышка).

Установленная по результатам секвенирования видовая принадлежность культуры клеток FRhK-4 (*Sus scrofa*, свинья) не соответствует исходной (*Macaca mulatta*, макака-резус), что не позволяет подтвердить подлинность данной закладки клеточной линии.

Отдельный интерес представляет культура клеток Ma-104, источником получения которой довольно долгое время считалась почечная ткань макаки-резус (*Macaca mulatta*). Данная культура включена в реестр ошибочно идентифицированных клеточных линий (Register of misidentified cell lines, <https://iclac.org/databases/cross-contaminations>). Информация о ее происхождении была пересмотрена Международным комитетом по идентификации клеточных линий ICLAC (ref: 220912) на основании результатов секвенирования CO1 гена, опубликованных в 2021 году [2]. В настоящее время по происхождению культура клеток Ma-104 отнесена к виду *Chlorocebus pygerythrus* (карликовая зелёная мартышка). Данная видовая принадлежность подтвердилась в результате проведенного ДНК-профилирования для задепонированной в коллекции клеточной культуры Ma-104.

Список литературы

1. ATCC. Species-level identification of animal cells through mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) DNA barcodes / ATCC SDO document ASN-0003. Manassas: ATCC Standards Development Organization, 2015. 152 p.
2. Lung O., Candlish R., Nebroski M., et al. High-throughput sequencing for species authentication and contamination detection of 63 cell lines // Sci. Rep. 2021. Vol. 11. doi: 10.1038/s41598-021-00779-5

Фомина Ю.С.¹✉, Загоскин Ю.Д.¹, Григорьев Т.Е.¹, Чвалун С.Н.^{1,2}

Гидрогелевые материалы на основе биоразлагаемых сополимеров для регенеративной медицины

¹ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

² ИСПМ им. Н.С. Ениколопова РАН, Москва, Россия

✉ ledy_uylia-98@mail.ru

Аннотация. Разработаны подходы к получению гидрогелевых материалов, позволяющие регулировать модуль упругости в широком диапазоне значений от 3 до 187 кПа за счет направленного изменения состава, конфигурации и степени кристалличности высокомолекулярного соединения, а также методик получения гидрогелей.

Ключевые слова: гидрогель; амфифильные блок-сополимеры; полилактид; полиэтиленгликоль; самоорганизация.

Fomina Y.S.¹, Zagoskin Y.D.¹, Grigoriev T.E.¹, Chvalun S.N.^{1,2}

Biodegradable copolymer hydrogel materials for regenerative medicine

¹ National Research Centre “Kurchatov Institute” Moscow, Russia

² Enikolopov Institute of Synthetic Polymeric Materials Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. Approaches have been developed for obtaining hydrogel materials that allow to adjust the elastic modulus over a wide range of values from 3 to 187 kPa through targeted modifications of the composition, configuration, degree of crystallinity of the macromolecular compound, the methods for producing the hydrogels.

Keywords: hydrogel; amphiphilic block copolymer; polylactide; polyethylene glycol; self-organization.

В настоящее время технологии трансплантации поврежденных органов и тканей человека позволяют существенным образом улучшить качество жизни пациентов. При всех достоинствах данных методов лечения стоит отметить ряд существенных недостатков: нехватка донорских органов; возможный риск развития иммунных реакций; необходимость в пожизненном приеме иммуносупрессивных препаратов с целью подавления иммунных реакций организма, что негативно сказывается на качестве жизни пациента, поскольку влечет за собой риск развития инфекционных осложнений, появления злокачественных новообразований и др. Кроме того, к одному из существенных недостатков трансплантации органов можно отнести ограниченную функциональность, которая в среднем составляет 10–15 лет, после чего требуется выполнение ретрансплантации.

Альтернативным подходом для решения данной проблемы является разработка биосовместимых и биоразлагаемых тканеинженерных конструкций, основу которых, как правило, составляет пористый полимерный каркас. Такие системы должны выполнять свои функции заданное время и выводиться из организма естественным путем при отсутствии иммунного ответа организма. Включение в подобные материалы факторов роста, которые стимулируют пролиферацию и дифференциацию клеток, а также самих клеток, будет способствовать регенерации собственной ткани пациента взамен поврежденной. Тканеинженерными каркасами могут быть гидрогели — коллоидные системы, состоящие из трехмерных сеток высокомолекулярных соединений и воды в качестве дисперсионной среды [1]. В физиологических условиях такие материалы проницаемы для метаболитов и способны удерживать достаточное количество воды. Дисперсной фазой

гидрогеля могут быть структуры из биосовместимых и биоразлагаемых амфифильных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля (PLA-PEG-PLA). Благодаря двойственной природе данные сополимеры способны к самоорганизации в водной среде в надмолекулярные структуры вследствие агрегации блоков полилактида. За счет проходных цепей полиэтиленгликоля из агрегатов формируется физическая сетка гидрогеля [1]. Для потенциальных биомедицинских применений важно уметь регулировать физико-механические свойства в широком диапазоне величин, что возможно за счет со-кристаллизации стереоизомерных полимерных цепей в процессе образования гидрогеля. Межмолекулярные взаимодействия энантиомерных цепей PLA противоположной конфигурации приводят к образованию прочного стереокомплекса. Формирование таких структур может существенно улучшать механические свойства, термостабильность, устойчивость к гидролитическому разложению материалов и др.

В данной работе была синтезирована серия тройных блок-сополимеров PLA-PEG-PLA различного состава (от 9 до 24 кДа) в растворе толуола при температуре 130°C в присутствии макроинициатора PEG и со-инициатора 2-этилгексаноата олова (II). В настоящем исследовании варьировали соотношение гидрофильного и гидрофобного блоков (1.5:1, 1:1, 0.5:1) и конфигурацию PLA-блоков, используя различные стереоизомеры лактида (L-лактид, D-лактид, D,L-лактид). На основе серии блок-сополимеров были разработаны гидрогелевые материалы методом замены растворителя. Образцы растворяли в «хорошем» для обоих блоков растворителе (1,4-диоксане), после чего заменяли его на дистиллированную воду. Вследствие амфифильной природы блок-сополимеров происходит агрегация блоков PLA с образованием физической сетки гидрогеля за счет мостиковых цепей PEG.

Для установления взаимосвязи наноструктуры материалов с их физико-механическими характеристиками полученные гидрогели были исследованы методами рентгеновского рассеяния и механического анализа. Методом малоуглового рентгеновского рассеяния было показано, что для гидрогелей с преимущественно аморфными узлами сетки с ростом степени полимеризации блоков увеличивается межплоскостное расстояние, вследствие образования более крупных агрегатов и вытягивания цепей PEG. Материалы на основе аморфных блок-сополимеров демонстрируют невысокие значения модуля упругости (не более 40 кПа), однако гидрогели способны поддерживать форму, что позволяет проводить механические испытания, о чем ранее не сообщалось для подобных систем. При переходе от аморфного блока полилактида к полукристаллическому можно отметить увеличение значений модуля упругости гидрогелей в несколько раз (до 100 кПа [2]), что связано с формированием кристаллитов α -модификации полилактида (рефлексы на 15,9° и 18,0° по данным широкоугового рентгеновского рассеяния) в процессе гелеобразования, которые упрочняют узлы физической сетки. Для стереокомплексных гидрогелей в некоторых случаях происходит увеличение значений модуля упругости в несколько раз по сравнению с гидрогелями на основе полукристаллических блок-сополимеров (до 187 кПа), что связано с образованием более прочных стереокомплексных кристаллитов (рефлексы на 11,3° и 19,3° по данным широкоугового рентгеновского рассеяния).

Работа выполнена в рамках соглашения о предоставлении из федерального бюджета грантов в форме субсидии № 075-15-2023-324 от 21 февраля 2023 г.

Список литературы

1. Фомина Ю.С., Семкина А.С., Загоскин Ю.Д., и др. Биосовместимые гидрогели на основе биоразлагаемых полиэфигов и их сополимеров // Коллоидный журнал. 2023. Т. 85, № 5. С. 682–704. EDN: ZAFXKE doi: 10.31857/S0023291223600554
2. Загоскин Ю.Д., Григорьев Т.Е., Крашенинников С.В., и др. Гидрогели и губчатые материалы на основе тройных блок-сополимеров лактида и этиленгликоля // Доклады академии наук. 2019. Т. 486, № 4. С. 433–436. EDN: HYICML doi: 10.31857/S0869-56524864433-436

Форысенкова А.А.¹✉, Фадеева И.В.¹, Луценко И.А.², Кошенкова К.А.²

Гранулы из альгината натрия и поливинилпирролидона для локальной доставки антибактериальных препаратов к пораженным участкам мягких тканей

¹ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

² Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

✉ aforysenkova@gmail.com

Аннотация. Разработаны пористые полимерные гранулы из альгината натрия и поливинилпирролидона, содержащие антибактериальные комплексы серебра(I) или меди(II). Материалы перспективны для использования в регенеративной медицине при лечении мягких тканей, поврежденных в результате травм и обширных операций.

Ключевые слова: координационные соединения серебра(I) или меди(II); пиросульфатная кислота; 2-индолкарбоновая кислота; 1;10-фенантролин; антибактериальная активность.

Forysenkova A.A.¹, Fadeeva I.V.¹, Lutsenko I.A.², Koshenskova K.A.²

Sodium alginate and polyvinylpyrrolidone granules for local delivery of antibacterial drugs to affected areas of soft tissues

¹ IMET RAS, Moscow, Russia

² IGIC, Moscow, Russia

Abstract. Porous polymer granules made of sodium alginate and polyvinylpyrrolidone containing antibacterial complexes of silver(I) or copper(II) have been developed. The materials are promising for use in regenerative medicine in the treatment of soft tissues damaged as a result of injuries and extensive operations.

Keywords: coordination compounds; silver; copper; phenanthroline; antibacterial activity.

Травмы и обширные операции, в том числе онкологические, приводят к значительной потере мягких тканей и кожи, что часто сопровождается инфекциями, которые осложняют процесс заживления и увеличивают период временной нетрудоспособности. Антибиотики традиционно используются для борьбы с инфекциями. Однако в последнее десятилетие из-за широкого применения антибиотиков в медицине и сельском хозяйстве возникла устойчивость к антибиотикам, поэтому ведется активный поиск замены антибиотикам. Одним из вариантов такой замены являются соединения, обладающие антибактериальной активностью, в частности координационные соединения (КС) серебра или меди [1]. Полимерные материалы, изготовленные из альгината натрия (ALG) и поливинилпирролидона (PVP), могут быть использованы для локальной доставки антибактериальных координирующих соединений в область поврежденных и инфицированных мягких тканей. Оба полимера являются биосовместимыми и биорезорбируемыми [2, 3]. Разработан метод микрокапсулирования КС с использованием ALG и PVP. Изучена микроструктура комплексов, содержащих микрокапсулы PVP и ALG — $[\text{Cu}(\text{fur})_2(\text{phen})]$ (1; fur — анион пиросульфоновой кислоты, phen — 1,10-фенантролин), $[\text{Ag}(\text{ikk})(\text{NH}_3)]$ (2; анион икк — 2-индолкарбоновой кислоты). Был исследован процесс высвобождения КС из микрокапсул ALG и PVP: было показано, что 80–90% КС высвобождается в течение первых трех дней. Чтобы замедлить высвобождение КС из микрокапсул, было предложено использовать 5%-ный водный раствор метилцеллюлозы, который увеличивает вязкость раствора КС. Были изучены микроструктура микрокапсул PVP и ALG, содержащих КС, и антибактериальная активность КС

в сравнении с антибактериальной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных штаммов бактерий группы ESCAPE. Разработанные материалы перспективны для использования в регенеративной медицине при лечении инфицированных мягких тканей.

The work was carried out with the financial support of State Assignment No. 075-00320-24-00.

Coordination compounds were synthesized within the framework of the State Assignment of the Institute of General and Inorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences.

Список литературы

1. Koshenskova K.A., Baravikov D.E., Khoroshilov A.V., et al. Polymer Cu²⁺ and Ag⁺ furancarboxylate complexes with 4,4'-bipyridine: synthetic approaches, structure, thermal behavior, and biological activity // RSC Advances. 2022. Vol. 72, N 8. P. 1894–1904. doi: 10.1007/s11172-023-3974-z
2. Fadeeva I.V., Trofimchuk E.S., Forysenkova A.A., et al. Composite polyvinylpyrrolidone–sodium alginate—Hydroxyapatite hydrogel films for bone repair and wound dressings applications // Polymers. 2021. Vol. 13, N 22. P. 3989. doi: 10.3390/polym13223989
3. Forysenkova A.A., Konovalova M.V., Fadeeva I.V., et al. Polyvinylpyrrolidone — alginate film barriers for abdominal surgery: anti-adhesion effect in murine model // Materials. 2023. Vol. 16, N 16. P. 5532. doi: 10.3390/ma16165532

Фотина А.С.^{1,2} ✉, Томилин А.Н.², Кузьмин А.А.²

Создание генно-инженерной платформы для направленного программирования клеток

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ sfotina1801@gmail.com

Аннотация. Искусственные системы регуляции экспрессии генов могут быть созданы на основе белков CRISPR-Cas, однако эффективность их работы сильно зависит от направляющих РНК (gRNA). Мы получили новую генно-инженерную платформу для отбора наиболее эффективных gRNA для направленного программирования клеток.

Ключевые слова: CRISPR; dCas12a; dCpf1; gRNA; регуляция экспрессии; программирование клеток.

Fotina A.S.^{1,2}, Tomilin A.N.², Kuzmin A.A.²

Establishment of a genetic engineering platform for targeted cell programming

¹ Saint Petersburg University, Saint Petersburg, Russia² Institute of Cytology Russian Academy of Science

Abstract. Artificial gene expression regulation systems can be created based on CRISPR-Cas proteins, but their efficiency is highly dependent on guide RNAs (gRNAs). We have obtained a novel genetic engineering platform for selecting the most effective gRNAs for targeted cell programming.

Keywords: CRISPR; dCas12a; dCpf1; gRNA; expression regulation; cell programming.

Генно-регуляторные программы в клетках живых организмов — результат взаимодействия и взаимной регуляции множества отдельных факторов. Одним из подходов для изучения этих взаимодействий является их моделирование — создание искусственных систем регуляции экспрессии генов. Они могут быть получены с использованием белков системы CRISPR-Cas, лишенных нуклеазной активности — dCas9 и dCas12a. В комплексе со специализированными направляющими РНК, эти белки способны узнавать ДНК-мишень и связываться с ней, что позволяет использовать их в качестве каркаса для прикрепления эффекторных доменов — активаторов или репрессоров транскрипции, и контролировать экспрессию любого гена, в том числе изменять программы дифференцировки клеток [1, 2].

Cas-белки могут взаимодействовать с несколькими направляющими РНК в клетке. Это позволяет создавать сложные, мультиплексные системы контроля экспрессии генов. В них могут входить как направляющие РНК, нацеленные на геномную ДНК клетки (например, для регуляции экспрессии факторов дифференцировки), так и работающие исключительно внутри своей изолированной системы — для более тонкого управления этими процессами. Известно, что вторичная структура и нуклеотидная последовательность направляющих РНК оказывают большое влияние на активность и специфичность работы Cas-белков, поэтому важно подбирать их с учетом специфики каждой конкретной системы [3].

В ходе нашей работы мы оптимизировали молекулярно-генетическую платформу для отбора последовательностей направляющих РНК для dCas12a, которые могли бы максимально эффективно изолированно работать в составе сложных генетических систем. Для этого мы интегрировали активирующую конструкцию dCas12a-VPR в локусы *AAVS1* и *CCR5* клеток линии НЕК293Т и протестировали, как изменится эффективность

активации экспрессии репортерного гена EGFP при использовании нескольких вариантов направляющих РНК, формирующих различные вторичные структуры. Мы показали, что индукция экспрессии EGFP зависит от того, насколько оптимальной является структура направляющей РНК для формирования комплекса с Cas12a-VPR, что подтверждает адекватность работы разработанной платформы. Тестируя с ее помощью многочисленные варианты последовательностей направляющих РНК, мы сможем отбирать наилучшие и использовать их в дальнейшей работе по созданию искусственных генных сетей для направленного программирования клеток.

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда № 24-75-10131.

Список литературы

1. Qi L.S., Larson M.H., Gilbert L.A., et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression // *Cell*. Vol. 152, N 5. P. 1173–1183. doi: 10.1016/j.cell.2013.02.022
2. Zhang X., Wang J., Cheng Q., et al. Multiplex gene regulation by CRISPR-ddCpf1 // *Cell Discov.* Vol. 3, N 1. P. 17018. doi: 10.1038/celldisc.2017.18
3. Kuzmin A., Tomilin A.N. Building blocks of artificial CRISPR-based systems beyond nucleases // *IJMS*. Vol. 24, N 1. P. 397. doi: 10.3390/ijms24010397

Фофанов Г.К.¹ ✉, Лихоманова Р.Б.^{1,2}, Юдинцева Н.М.^{1,2}, Бобков Д.Е.^{1,2}, Шевцов М.А.^{1,2}

Исследование миграционных характеристик высокоинвазивной субпопуляции клеток глиомы крысы C6

¹ ФГБУ НМИЦ им В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

✉ fofanovgeorgij@gmail.com

Аннотация. К особенностям злокачественных глиальных опухолей относятся гетерогенность, высокий миграционный и инвазивный потенциал. Настоящее исследование выявило высокоподвижную субпопуляцию клеток в линии глиомы крысы C6, которая, вероятно, связана с развитием и распространением новообразования.

Ключевые слова: злокачественные глиомы; Transwell; миграция клеток; клеточная подвижность.

Fofanov G.K.¹, Likhomanova R.B.^{1,2}, Yudincheva N.M.^{1,2}, Bobkov D.E.^{1,2}, Shevtsov M.A.^{1,2}

Investigation of migration characteristics of a highly invasive subpopulation of rat glioma cell line C6

¹ Personalized Medicine Centre, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia² Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The main feature of high-grade gliomas is their heterogeneity and high migratory and invasive potential. The present study demonstrates the presence of a highly mobile cell subpopulation in the rat C6 glioma line, which is likely associated with tumor progression and spreading.

Keywords: high-grade gliomas; Transwell; cell migration; cell motility.

Злокачественные глиальные опухоли обладают гетерогенностью и высоким инвазивным потенциалом, что затрудняет раннюю диагностику и своевременное лечение, в связи с чем представляют серьезную медико-социальную проблему [1]. Изучение механизмов клеточной подвижности, которые играют ключевую роль в процессах миграции и инвазии, является важным аспектом в решении этой проблемы. В связи с этим особый интерес вызывает исследование наиболее инвазивных субпопуляций опухолевых клеток, которые способствуют поддержанию агрессивного фенотипа опухоли и ее прогрессии. В настоящем исследовании в качестве модельного объекта использовали иммортализованную клеточную линию C6 глиомы крысы, предоставленную Центром коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде ДМЕМ (БиолоТ, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки коров (FBS) (BioWest, Франция) и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) при 37 °C и 5% CO₂. Для выделения высокоинвазивной субпопуляции клеток линии C6 глиомы крысы использовали систему Transwell (NEST, Китай) [2, 3]. Для этого в верхнюю камеру помещали суспензию клеток в среде без FBS, а в нижнюю — среду с 10% FBS; через 24 часа мигрировавшие через мембрану клетки снимали с помощью 0,25% раствора трипсин-ЭДТА (Gibco, США) и культивировали до достижения 90% конfluence. Данную процедуру проводили последовательно шесть раз на одной и той же группе клеток, в результате чего получили субпопуляцию C6Tw₆. Клетки C6Tw₆ рассеивали в 12-луночный планшет и выполняли оценку средней скорости движения с помощью автоматической системы визуализации клеток Image ExFluorger (LCI, Корея) ($n_{\text{клеток}} \geq 200$). В качестве контроля использовали нативную клеточную линию C6. При сравнении миграционных характеристик C6Tw₆ с контрольной линией выявили достоверные

отличия (тест Манна–Уитни, $p < 0,0001$). Прижизненный трекинг показал, что средняя скорость субпопуляции C6Tw₆ в 1,78 раза выше, чем в контроле — $9,1 \pm 4,5$ мкм/ч против $5,1 \pm 4,0$ мкм/ч соответственно (значения представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение). Полученные данные свидетельствуют о гетерогенности клеточной линии C6 и наличии в ней субпопуляции клеток с высокой клеточной подвижностью. Изучение молекулярных основ подвижности таких субпопуляций клеток, ответственных за экспансивное поведение опухоли и присутствующих как в иммортализованных клеточных линиях, так и в первичных клетках, позволит выявить новые таргетные мишени для терапии злокачественных новообразований. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

Список литературы

1. Luo C., Xu S., Dai G., et al. Tumor treating fields for high-grade gliomas // Biomed Pharmacother. 2020. Vol. 127. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110193
2. Marshall J. Transwell invasion assays. In: Marshall J., Wells C., Parsons M. Transwell invasion assays. Cell migration. Methods in Molecular Biology. 2011. Vol. 769. doi: 10.1007/978-1-61779-207-6_8
3. Justus C.R., Marie M.A., Sanderlin E.J., et al. Transwell *in vitro* cell migration and invasion assays // Methods Mol Biol. 2023. Vol. 2644. P. 349–359. doi: 10.1007/978-1-0716-3052-5_22

Фурса Г.А.^{1,2} ✉, Чадин А.В.¹, Карсунцева Е.К.¹, Воронова А.Д.¹, Шишкина В.С.¹, Лазарева П.А.², Степаненко А.А.¹, Решетов И.В.³, Степанова О.В.¹, Чехонин В.П.^{1,2}

Применение клеток обонятельной выстилки в фибриновых гидрогелях для терапии кист спинного мозга

¹ ФГБУ НМИЦ психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия

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

³ Университетская клиническая больница № 1 ФГАУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

✉ gregorii.fursa@gmail.com

Аннотация. Были изучены различные варианты биоинженерных препаратов на основе фибринового гидрогеля и обкладочных клеток из обонятельной выстилки. С помощью проведенных тестов была продемонстрирована терапевтическая эффективность препарата с концентрацией фибрина 10 мг/мл в терапии кисты спинного мозга.

Ключевые слова: фибриновый гидрогель; обкладочные клетки; обонятельная выстилка; киста спинного мозга; клеточная терапия; регенеративная медицина.

Fursa G.A.^{1,2}, Chadin A.V.¹, Karsuntseva E.K.¹, Voronova A.D.¹, Shishkina V.C.¹, Lazareva P.A.², Stepanenko A.A.¹, Reshetov I.V.³, Stepanova O.V.¹, Chekhonin V.P.^{1,2}

Use of olfactory mucosa cells in fibrin hydrogels for the treatment of spinal cord cysts

¹ The Serbsky State Scientific Center for Social and Forensic Psychiatry, Moscow, Russia

² Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ University Clinical Hospital No. 1, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Various options for bioengineer drugs based on fibrin hydrogel and ensheathing cells from the olfactory mucosa were studied. With the help of tests, the therapeutic effectiveness of the drug with a fibrin concentration of 10 mg/ml in the therapy of the spinal cord cyst was demonstrated.

Keywords: fibrin hydrogel; ensheathing cells; olfactory mucosa; spinal cord cyst; cell therapy; regenerative medicine.

Терапия травм спинного мозга — актуальная проблема современной медицины. Решением данной проблемы может являться применение клеточной терапии. Однако большое количество работ сконвертировано на использовании суспензии клеток. Данный подход сопряжен с высоким процентом гибели клеток в зоне введения [1]. Альтернативным подходом является доставка клеток в составе трехмерных конструкций, которые смогут имитировать естественное окружение клеток. Примером таких конструкций могут являться гидрогели. Данный тип контракций может быть введен в ткань через иглу, способствуя выживанию клеток в момент трансплантации и поддерживая их в дальнейшем. Особый интерес вызывают гидрогели на основе фибриногена, поскольку данный белок способен быстро образовывать плотную структуру после введения. Также немаловажно выбрать оптимальный клеточный компонент биоинженерного конструкта. Одним из наилучших вариантов являются обкладочные клетки из обонятельной выстилки, поскольку их получение безопасно для пациента, а множественные клинические испытания показали их безопасность [2].

Целью данной работы является применение клеток обонятельной выстилки в фибриновых гидрогелях для терапии кист спинного мозга.

Обкладочные клетки из обонятельной выстилки человека были получены по разработанному нами протоколу [3]. Образование кисты подтверждали методом МРТ через 4 недели после травмы. В ходе эксперимента исследовали фибриновые гидрогели с концентрацией фибриногена 4 мг/мл и 10 мг/мл и 1 единицей тромбина. В тестах *in vitro* оценивали выживаемость клеток, меченных прижизненным мембранным красителем РКН-26, в гелях разной концентрации, посредством теста с резазурином. 1 млн меченых РКН-26 клеток смешивали с раствором фибриногена (9 мкл) и смешивали с раствором тромбина (1 мкл) непосредственно перед введением. Терапевтическая эффективность препаратов была оценена по улучшению двигательной активности задних конечностей крыс в течение 4 недель с помощью BBB-тестов.

В ходе тестов *in vitro* было показано, что клетки в фибриновых гидрогелях в течение 7 суток эксперимента снижали свою жизнеспособность. В ходе тестов *in vivo* было показано, что гидрогели с концентрацией фибриногена в 4 мг/мл не превосходят в своей терапевтической эффективности суспензию клеток. В то же время гидрогель на основе 10 мг/мл показывает многообещающие результаты, однако для достижения более значимого различия требуется увеличить группу. С точки зрения изменения морфометрических параметров кисты клетки в составе гидрогелей не превосходят по своей эффективности суспензию клеток.

Полученные результаты говорят нам о том, что фибриновые гидрогели могут являться эффективным носителем клеток для терапии кист спинного мозга, однако требуются дальнейшие изыскания в данном направлении.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 12402080066-3 (8 февраля 2024 г.).

Список литературы

1. Sivaraj D., Chen K., Chattopadhyay A., et al. Hydrogel scaffolds to deliver cell therapies for wound healing // Front Bioeng Biotechnol Frontiers. 2021. Vol. 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.660145
2. Reshamwala R., Murtaza M., Chen M., et al. Designing a clinical trial with olfactory ensheathing cell transplantation-based therapy for spinal cord injury: a position paper // Biomedicines. 2022. Vol. 10, N 12. P. 3153. doi: 10.3390/biomedicines10123153
3. Stepanova O., Voronova A.D., Chadin A.V., et al. Neurotrophin-3 enhances the effectiveness of cell therapy in chronic spinal cord injuries // Bull Exp Biol Med. 2022. Vol. 173, N 1. P. 114–118. doi: 10.1007/s10517-022-05504-4

Хабарова А.А.¹✉, Ян А.П.^{1,2}, Сальников П.А.^{1,2}, Гридина М.М.^{1,2}, Кокшарова Г.С.^{1,2}, Фишман В.С.^{1,2}

Использование системы CRISPR/Cas 9 при создании ИПСК модели для изучения роли структурных вариантов локуса AUTS2 в развитии нейродегенеративных заболеваний

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

✉ anya.khabarova@gmail.com

Аннотация. Метод Exo-C выявил хромосомную перестройку возле важного для развития нервной системы гена AUTS2. Аллель-специфичный анализ экспрессии гена в нейральных предшественниках, полученных из линий ИПСК с синонимичной заменой в экзоне, позволит оценить функциональное значение хромосомной перестройки.

Ключевые слова: ИПСК; экзомное секвенирование; AUTS2; регуляторные элементы; CRISPR/Cas 9; редакторы оснований.

Khabarova A.A.¹, Yan A.P.^{1,2}, Salnikov P.A.^{1,2}, Gridina M.M.^{1,2}, Koksharova G.S.^{1,2}, Fishman V.S.^{1,2}

Using the CRISPR/Cas9 system to create a iPSC models to study the role of AUTS2 locus structural variants in the development of neurodegenerative diseases

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

Abstract. The Exo-C method revealed a chromosomal rearrangement near important for the nervous system development AUTS2 gene. An allele-specific analysis of gene expression in neural progenitors derived from iPSC lines with SNP will allow us to assess the functional significance of chromosomal rearrangement.

Keywords: iPSC; exome sequence; AUTS2; regulatory elements; CRISPR/Cas 9; base editors.

Геномные исследования показали, что значительная доля патогенных вариантов затрагивает не сами гены, а некодирующие участки генома [1]. Наша работа направлена на характеристику регуляторного ландшафта гена AUTS2, нарушения которого часто наблюдаются у пациентов с нейродегенеративными заболеваниями и заболеваниями аутистического спектра. Современные исследования указывают на то, что AUTS2 является критическим геном для широкого спектра нарушений развития нервной системы и неврологических аномалий с высокой пенетрантностью [2]. Метод Exo-C позволяет обнаруживать различные структурные варианты, в том числе инверсии и сбалансированные транслокации. С помощью метода экзомного секвенирования нами был выявлен пациент со множественной хромосомной перестройкой, которая в том числе затрагивает межгенный промежуток между генами AUTS2 и GALNT17 (7-я хромосома). Из мононуклеаров крови данного пациента были получены и охарактеризованы 12 линий ИПСК. Для маркирования аллелей внесена синонимичная замена в кодирующую часть гена AUTS2 (10 экзон) путем направленного редактирования генома системой CRISPR/Cas9. Использование модифицированного белка Cas9 в комплексе с цитидиновой и аденозиновой дезаминазой позволило нам получить однонуклеотидные замены в нужном месте без дополнительных мутаций. На основе метода NGS секвенирования был разработан быстрый способ массового выявления клеточных линий, несущих необходимую однонуклеотидную замену. Всего было получено 19 линий ИПСК с внесенной мутацией. На следующем этапе мы планируем установить,

какой именно аллель (перестроенный или нет) был замаркирован. Анализ аллельной экспрессии гена *AUTS2* в нейральных предшественниках и кортикальных нейронах, полученных при направленной дифференцировке [3] маркированных линий ИПСК, позволит ответить нам на вопрос о влиянии хромосомной перестройки на экспрессию гена.

Работа поддержана грантом РФФ 24-25-00152.

Список литературы

1. Boix C.A., James B.T., Park Y.P., et al. Regulatory genomic circuitry of human disease loci by integrative epigenomics // *Nature*. 2021. Vol. 590, N 7845. P. 300–307. doi: 10.1038/s41586-020-03145-z
2. Jolley A., Corbett M., McGregor L., et al. *De novo* intragenic deletion of the autism susceptibility candidate 2 (*AUTS2*) gene in a patient with developmental delay: a case report and literature review // *Am J Med Genet A*. 2013. Vol. 161A, N 6. P. 1508–1512. doi: 10.1002/ajmg.a.35922
3. Muratore C.R., Srikanth P., Callahan D.G., et al. Comparison and optimization of hiPSC forebrain cortical differentiation protocols // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, N 8. doi: 10.1371/journal.pone.0105807

Хабекирова С.А. ✉, Пыхтина П.А., Кобзев М.В.

Цитотоксический эффект В-дефензина на линейные культуры фибробластов

ФГБОУ ВО Ставропольский Государственный Медицинский Университет Минздрава России, Ставрополь, Россия

✉ saidahabekirova@gmail.com

Аннотация. В ходе эксперимента изучено цитотоксическое действие бета-дефензина на линейные культуры фибробластов в различных концентрациях. Результаты исследования могут способствовать дальнейшей разработке способов применения дефензинов в регенеративной медицине.

Ключевые слова: антимикробные пептиды; бета-дефензин; цитотоксичность; антибактериальная активность.

Khabekirova S.A., Pykhtina P.A., Kobzev M.V.

Cytotoxic effect of beta-defensin on linear fibroblast cultures

FSBEO HE Stavropol State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Stavropol, Russia

Abstract. During the experiment the cytotoxic effect of beta-defensin on linear fibroblast cultures was studied at various concentrations. The results of the study may contribute to the further development of ways to use defensins in regenerative medicine.

Keywords: antimicrobial peptides; beta-defensin; cytotoxicity; antibacterial activity.

Важным направлением развития медицины России и мира в настоящее время является поиск новых лекарственных средств. Это особенно актуально в настоящее время, так как повсеместно распространена антибиотикорезистентность, в связи с чем требуется обширный поиск и разработка новых противомикробных препаратов. С этой точки зрения дефензины (как и антимикробные пептиды в целом) представляют большой интерес. Было показано, что дефензины обладают выраженной антибактериальной активностью в отношении широкого спектра возбудителей. Кроме того, дефензины позволяют усилить эффективность антибиотиков, уже используемых в медицинской практике [1]. Антимикробные пептиды представляют собой первую линию защиты организма против широкого спектра патогенов, включая бактерии, грибы, оболочечные вирусы. Механизм антибактериального действия дефензинов связан с формированием порообразных разрывов клеточной мембраны микроорганизма, что приводит к нарушению барьерной функции мембраны и в последующем к гибели возбудителя [2]. Но одним из наиболее главных недостатков дефензинов является их цитотоксичность в отношении клеток млекопитающих, что мы и проследили, сравнивая контрольные группы клеток без добавления бета-дефензина в культуральную среду и опытные группы, в среду для культивирования которых был внесен бета-дефензин в различных концентрациях.

Эксперимент проводился на эмбриональных фибробластах мыши линии СЗНА (БиолоТ). Клетки рассеивались в лунки 24-луночного культурального планшета (Thermo Scientific) по $2 \cdot 10^4$ живых клеток в 500 мкл среды DMEM (Sigma) с добавлением 5% фетальной телячьей сыворотки FBS (Gibco) без антибиотика. Рекомбинантный человеческий дефензин DEFb103A (Cloud-Clone Corp.) разводили стерильным раствором Хэнкса (БиолоТ) и вносили в опытные группы в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл. Планшеты инкубировали в течение 96 часов при 37°C и 5% CO₂. Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. В каждой лунке заменяли среду на 0,8 мл свежей среды DMEM и затем добавляли 80 мкл активированного раствора EZ4U и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3,5 часов. После чего образцы извлекали и измеряли оптическое поглощение раствора с использованием

многофункционального фотометра-имиджера Cytation 1 (BioTek) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли оптическую плотность относительно положительного контроля (интактные клетки) в %. Оценку механизмов клеточной гибели проводили при помощи системы проточной цитометрии Novocyte 3000 (ACEA Biosciences) с использованием аннексина V, конъюгированного с AF488, и йодистого пропидия (Lumiprobe).

Пролиферативная активность клеток, культивированных в среде с добавлением дефензина в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/мл, была достоверно ниже контроля и составила $57,85\% \pm 4,355\%$ ($t = 7,003$, $p < 0,001$), $72,41\% \pm 3,318\%$ ($t = 5,189$, $p < 0,001$) и $52,22\% \pm 9,568\%$ ($t = 4,580$, $p < 0,001$) соответственно. Доля клеток, подвергшихся апоптозу, была наибольшей при добавлении дефензина в концентрации 20 мкг/мл и составляла $274,16\% \pm 16,519\%$ ($t = 6,234$, $p < 0,001$) в сравнении с контролем.

Полученные данные убедительно свидетельствуют о проявлении цитотоксичности дефензина в указанных концентрациях, при этом в наименьшей степени этот эффект проявлялся в концентрации 10 мкг/мл. Результаты исследования могут способствовать дальнейшей разработке способов применения дефензинов в регенеративной медицине. Углубленное изучение антимикробных пептидов, в частности дефензинов, представляет огромный научный интерес и дает возможность разрабатывать новые подходы к этиотропной и патогенетической терапии различных заболеваний.

Список литературы

1. Болатчиев А.Д. Спектр антибактериальной активности дефензинов в отношении грамположительных и грамотрицательных бактериальных штаммов, выделенных у госпитализированных пациентов // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2020. Т. 15, № 4. С. 576–577. EDN: EZXIUE doi: 10.14300/mnnc.2020.15137
2. Bolatchiev A., Baturin V., Bazikov I., et al. Effect of antimicrobial peptides HNP-1 and hBD-1 on *Staphylococcus aureus* strains *in vitro* and *in vivo* // *Fundam Clin Pharmacol*. 2020. Vol. 34, N 1. P. 102–108. doi: 10.1111/fcp.12499

Халиуллин М.Р. ✉

Généra — о генеративной медицине

Alabuga International School, Елабуга, Россия

✉ marcel.xaliulla@gmail.com

Аннотация. Проект Généra — это философский проект в тканевой инженерии, направленный на преодоление текущих ограничений и завершение революции в создании тканей. В основе работы лежат концепции современной материалистической философии и «ткачества», что открывает новые перспективы в регенеративной медицине.

Ключевые слова: тканевая инженерия; философия; регенеративная медицина.

Khaliullin M.R.

Généra — on generative medicine

Alabuga International School, Yelabuga, Russia

Abstract. The Généra project is a philosophical project in tissue engineering that aims to overcome current limitations and complete the revolution in tissue engineering. The work is based on the concepts of modern materialist philosophy and “weaving”, which opens up new perspectives in regenerative medicine.

Keywords: tissue engineering; philosophy; regenerative medicine.

Тканевая инженерия и регенеративная медицина (TERM) достигли значительных успехов в создании сложных многоклеточных систем. Однако, несмотря на значительный прогресс, революция так и остается незавершенной. Технологии, такие как биопринтинг и создание органоидов, оказали значительное влияние на создание протезов, замену органов, тестирование лекарств и даже производство искусственного мяса, но их развитие значительно отклонилось от первоначальной цели — создания органов *de novo*.

На фоне этой технологической эволюции мой проект предлагает философский анализ, который критически переосмысливает текущие методологии с их еще нераскрытым потенциалом. В работе будет показано, как философская деконструкция методов тканевой инженерии и выявление ключевых философских различий могут привести к более глубокому пониманию проблемы создания органов.

Первое различие проводится между концепцией ткани как таковой и тканевой инженерией. Тканевая инженерия в своей основе представляется как отход от различных центризмов (геноцентризм, клеточный центризм, биофизический центризм). В рамках этого подхода выделяются три фундаментальных режима создания тканей: морфический (доминирование формы), гилломорфический (равное взаимодействие формы и материи) и гилический (полное доминирование материи и её самоорганизация). Создается некий концептуальный «треугольник», который может быть использован для категоризации современных методов в тканевой инженерии. Эта область «инженерии инженеров» откроет новые возможности для создания новых методологий и машин тканевой инженерии; первых машин, способных «ткать» настоящие биологические ткани по правилам самой ткани.

Проект Généra также описывает две противоположные концепции «органов» и «Тела без Органов» (ТБО), изначально предложенные Жилем Делёзом и Феликсом Гваттари. ТБО можно рассматривать как состояние ткани, свободное от заранее заданных структур и форм, готовое к новой генеративности и детерриторизации (условная «стволовость»). Органы же есть продукты детерриторизации потоков тканевого желаяния, которые противостоят бесконечному ускользанию ТБО. Нашей задачей является найти способ противостоят ретерриторизации тканевых потоков, преодолевая ограничения, навязанные гистологическими представлениями

о правильном строении тканей, и научиться переключаться между режимами территоризации и детерриторизации.

В заключение будет продемонстрирована возможность создания универсальной машины для тканевой инженерии (Généra), которая сможет работать с тканями как с тканями и заполнит пустующую нишу в методологии тканевой инженерии. Она завершит начатую революцию и откроет новые возможности в исследованиях в регенеративной медицине, которая может стать «генеративной медициной» — медициной, создающей новое.

Список литературы

1. Aristarkhova I. Hospitality of the matrix: philosophy, biomedicine, and culture. Columbia University Press, 2012. doi: 10.7312/aris15928
2. Bijker W.E., Hughes T.P., Pinch T., editors. The social construction of technological systems: new directions in the sociology and history of technology. The MIT Press, 2012. 470 p.
3. Van Gennep A. The rites of passage. Chicago: University of Chicago Press, 1960.
4. Deleuze G. Difference and repetition. London: Athlone Press, 1994.
5. Khaliullin M. Généra — a tissue engineering machine. In: EMBL-IBEC conference engineering multicellular systems. 2024. P. 50–51. Дата обращения: 20.10.2024. Режим доступа: <https://events.ibecbarcelona.eu/embl-ibec-conference/wp-content/uploads/sites/27/2024/04/Posters-with-abstracts-1.pdf>

Хандохин М.М.¹ ✉, Лобанова М.А.², Слободкина Е.А.³, Макаревич П.И.³, Еремичев Р.Ю.³

Строма роговицы демонстрирует внутреннюю способность к регенерации после щелочного ожога, несмотря на временное формирование миофибробластов

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

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

³ Центр регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ m_khandokhin@inbox.ru

Аннотация. Роговица обладает способностью регенерировать после щелочного ожога. Регенерирующий ответ, в отличие от нерегенерирующего, характеризуется восстановлением прозрачной стромы, несмотря на транзистное образование миофибробластов, отсутствием неоваскуляризации и восстановлением эндотелия.

Ключевые слова: регенерация роговицы; щелочной ожог; неоваскуляризация роговицы; бельмо; повреждение эндотелия; миофибробласты; мышинная модель.

Khandokhin M.M.¹, Lobanova M.A.², Slobodkina E.A.³, Makarevich P.I.³, Eremichev R.Yu.³

Corneal stroma demonstrates endogenous regeneration after alkali burn despite transient myofibroblast formation

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Centre for Regenerative Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Cornea has an ability to regenerate after massive injury by alkali burn. Regenerative response, in contrast to non-regenerative, is characterized by transparent stroma restoration, despite transient myofibroblast formation, lack of neoangiogenesis and normal endothelium restoration.

Keywords: corneal regeneration; alkali burns; corneal neovascularization; haze; endothelial injury; myofibroblasts; mice models.

Помутнение роговицы вызывает не менее 5% от всех случаев слепоты в мире [1]. Основным консервативным методом лечения является нанесение кортикостероидов и митомидина С, применение которых ограничено в случае инфекционных поражений и может иметь долгосрочные побочные эффекты в виде катаракты и глаукомы [2]. Основные клинически неблагоприятные последствия повреждения роговицы — образование бельма и неоваскуляризация, происходящие в строме роговицы. При этом эндогенная способность стромы роговицы к регенерации остается дискуссионным вопросом. Если регенеративные механизмы действительно присутствуют в роговице, то их стимуляция может стать новым методом лечения, дополняя существующие современные подходы.

Целью данной работы было разработать модели регенерирующего и нерегенерирующего щелочного ожога роговицы у мыши и сравнить основные изменения тканей при двух указанных типах ответов.

Щелочные ожоги роговицы были индуцированы путем нанесения круглых фрагментов фильтровальной бумаги радиусом 2 мм, смоченных растворами NaOH концентрации 0,25М, 0,5М и 1,0М. Все мыши были разделены на 3 группы по времени вывода из эксперимента (3 часа, 7 дней и 21 день). Непосредственно перед выводом проводилась стереомикроскопия для оценки прозрачности роговицы. Далее мы выполняли иммуногистохимическое мечение цельных роговиц на α SMA (все временные точки), а также на маркеры

кровеносных (CD31) и лимфатических (LYVE1) сосудов (7-й и 21-й день после повреждения). Данные были получены методом конфокальной микроскопии с последующей объемной морфометрией в программе FIJI.

После прижизненной оценки прозрачности роговицы мы обнаружили, что нанесение щелочи в концентрации 1,0M приводило к появлению бельма у всех животных, тогда как роговицы после нанесения концентрации 0,5M и ниже всегда были визуально прозрачны, т.е. регенерировали. При этом изначальные объем и глубина повреждения были очень выраженными: даже в концентрации 0,25M NaOH вызывал выраженный некроз по всей толще роговицы. Для изучения процессов, протекающих в роговице после повреждения, мы сравнивали регенерирующий ответ тканей после нанесения 0,5M NaOH и нерегенерирующий — после нанесения 1,0M NaOH.

Мы обнаружили, что на 7-й день после повреждения и регенерирующий, и нерегенерирующий ответы проходили через стадию увеличения общего числа клеток и появления α SMA-положительных миофибробластов, при этом часть этих клеток и миофибробластов исчезала к 21-му дню. Однако исчезновение большей части миофибробластов после нерегенерирующего повреждения не приводило к восстановлению прозрачности, что, по-видимому, связано с оставшимся после них дезорганизованным внеклеточным матриксом.

Эндотелий роговицы восстанавливался к 21-му дню после регенерирующего повреждения, тогда как после нерегенерирующего на его месте в зоне повреждения формировались α SMA-положительные кластеры клеток, которые указывают на протекание эндотелиально-мезенхимального перехода, возможность которого описана в литературе [3]. Важно отметить, что на 7-й день после регенерирующего повреждения α SMA-положительный эндотелий также наблюдался, что не препятствовало его дальнейшему восстановлению.

Неоваскуляризация наблюдалась только после нерегенерирующего повреждения, причем кровеносные сосуды были зрелые уже на 7-й день, на что указывало их иммунофлуоресцентное мечение на α SMA. Общий объем и протяженность сосудов не менялись от 7-го до 21-го дня после повреждения.

Таким образом, мы обнаружили что в роговице реализуется 2 принципиально разные программы ответа на повреждение: регенерирующая, при которой, несмотря на временное формирование миофибробластов, поддерживается организованное прозрачное состояние внеклеточного матрикса стромы, происходит восстановление нормального эндотелия и отсутствует неоваскуляризация, а также нерегенерирующая, при которой происходит устойчивое изменение структуры стромы, формирование кластеров α SMA-положительных клеток вместо нормального эндотелия, а также прорастание кровеносных и лимфатических сосудов. Разработанная в данной работе модель позволяет сравнивать регенерирующие и нерегенерирующие программы ответа роговицы на повреждение, что в перспективе позволит разработать методы молекулярной или клеточной терапии, направленные на запуск регенерирующего ответа при нерегенерирующем повреждении.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и по перспективному направлению научно-образовательного развития Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Список литературы

1. Witcher J.P., Srinivasan M., Upadhyay M.P., et al. Corneal blindness: a global perspective // Bull World Health Organ. 2001. Vol. 79, N 3. P. 214–221.
2. Kwok S.S., Shih K.C., Bu Y., et al. Systematic review on therapeutic strategies to minimize corneal stromal scarring after injury // Eye Contact Lens. 2019. Vol. 45, N 6. P. 347–355. doi: 10.1097/ICL.0000000000000584
3. Lee J., Jung E., Heur M. Injury induces endothelial to mesenchymal transition in the mouse corneal endothelium *in vivo* via FGF2 // Mol Vis. 2019. Vol. 25. P. 22–34.

Ханова М.Ю. ✉, Матвеева В.Г., Антонова Л.В.

Персонафицированный клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра: итоги экспериментального исследования

НИИ КПССЗ, Кемерово, Россия

✉ khanovam@gmail.com

Аннотация. Разработан персонафицированный клеточнозаселенный сосудистый протез малого диаметра из полигидроксibuтирата/валерата и поликапролактона с фибриновым покрытием с воссозданным в условиях пульсирующего потока внутренним эндотелиальным монослоем из колониеформирующих эндотелиальных клеток человека.

Ключевые слова: тканевая инженерия; аутологичные эндотелиальные клетки; пульсирующий поток; персонафицированный сосудистый протез.

Khanova M.Yu., Matveeva V.G., Antonova L.V.

Personalized cell-populated small-diameter vascular prosthesis: results of an experimental study

Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russia

Abstract. A personalized small-diameter cell-populated vascular prosthesis made of polyhydroxybutyrate/valerate and polycaprolactone with a fibrin coating, with an internal endothelial monolayer of colony-forming endothelial cells recreated under pulsating flow conditions, has been developed.

Keywords: tissue engineering; autologous endothelial cells; pulsatile flow; personalized vascular prosthesis.

Актуальность настоящего исследования обусловлена отсутствием эффективных сосудистых протезов малого диаметра. Низкая скорость кровотока провоцирует мгновенное тромбообразование при контакте с инородной поверхностью полимера. Применение протезов из биостабильных синтетических полимеров, показавших свою эффективность при протезировании крупных сосудов, оказалось не пригодно для протезирования сосудов малого диаметра [1]. Эндотелизация поверхности сосудистого протеза способна увеличить его тромборезистентные свойства, обеспечить раннюю проходимость и поддерживать проходимость в дальнейшем [2]. С целью улучшения клеточной интеграции проведена поверхностная модификация фибрином. Для адаптации клеток к физиологическим условиям применяется физиологически обусловленная технология прекодиционирования напряжением сдвига [3]. Полимерные биodeградируемые трубчатые каркасы (диаметром 4 мм) из смеси 5% раствора поли(3-гидроксibuтирата-ко-3-гидроксивалерата) (PHBV) и 10% раствора поли(ε-капролактона) (PCL) были изготовлены методом электроспиннинга на установке Nanop-01A. Полимерные каркасы погружали в раствор фибриногена с концентрацией 30–40 мг/мл, затем наносили смесь тромбина и CaCl₂. Культуру колониеформирующих эндотелиальных клеток (КФЭК) получали культивированием мононуклеарной фракции крови пациентов с ишемической болезнью сердца и использовали для заселения протезов. Клеточнозаселенные PHBV/PCL/фибрин/КФЭК протезы культивировали в статических условиях (статика) и пульсирующего потока (динамика) с напряжением сдвига 2,85 дин/см². Полученные образцы оценивали с помощью сканирующей электронной и иммунофлуоресцентной микроскопии, полно-транскриптомного секвенирования. Индекс деформации тромбоцитов при контакте с фибриновым слоем составил 2,53, максимум агрегации тромбоцитов с индуктором агрегации 84,0%, в спонтанном режиме 9,5%,

относительно аналогичных показателей PNBV/PCL протезов — 3,04; 86,0%; 7,3%. Выявлена полная сохранность жизнеспособности КФЭК, независимо от условий культивирования. Поток стимулировал увеличение в 1,5 раза синтеза специфических эндотелиальных маркеров vWF, CD309 и белка фокальной адгезии Talin, что может быть косвенным свидетельством качественной адгезии и адаптации к потоку. При сравнении транскриптомов КФЭК, культивированных в различных условиях, было идентифицировано 185 значимых дифференциально экспрессируемых генов (ДЭГ), которые можно условно разделить на 2 обширные группы: «эндотелиальный метаболизм» (62 ДЭГ) и «процессы, участвующие в биологии эндотелия» (63 ДЭГ). Поток активировал в КФЭК гены, относящиеся к категории «эндотелиальный метаболизм» (39 ДЭГ в динамике против 23 ДЭГ в статике). При анализе ДЭГов в категории «процессы, участвующие в биологии эндотелия» в ответ на поток выявлено повышение экспрессии генов, кодирующих: 1) белки, обеспечивающие развитие кровеносных сосудов (3 ДЭГ в динамике против 2 ДЭГ в статике); 2) белки, ответственные за регуляцию целостности эндотелия (9 ДЭГ против 6 ДЭГ в статике); 3) стимулирующие ангиогенез белки (48 ДЭГ против 33 ДЭГ в статике); 4) белки, определяющие пролиферацию эндотелиальных клеток (17 ДЭГ против 12 ДЭГ в статике); 5) белки, способствующие миграции эндотелиальных клеток (21 ДЭГ против 15 в статических условиях); 6) белки, ответственные за регуляцию воспаления (20 ДЭГ против 16 ДЭГ в статике). Разработан персонифицированный клеточнозаселенный сосудистый протез с применением эффективной технологии прекондиционирования напряжением сдвига для адаптации эндотелиального слоя к потоку.

Список литературы

1. Leal B.B., Wakabayashi N., Oyama K., et al. Vascular tissue engineering: polymers and methodologies for small caliber vascular grafts // *Front Cardiovasc Med.* 2021. Vol. 7. doi: 10.3389/fcvm.2020.592361
2. Niklason L.E., Lawson J.H. Bioengineered human blood vessels // *Science.* 2020. Vol. 370, N 6513. doi: 10.1126/science.aaw8682
3. Davis M.J., Earley S., Li Y.S., et al. Vascular mechanotransduction // *Physiol Rev.* 2023. Vol. 103, N 2. P. 1247–1421. doi: 10.1152/physrev.00053.2021

Харченко М.В.¹✉, Каменцева Р.С.¹, Кошеверова В.В.¹, Корнилова Е.С.^{1,2}

Экспрессия и секреция лиганда рецептора эпидермального фактора роста амфирегулина в мезенхимных стромальных клетках человека

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ kharchenko_m@incras.ru

Аннотация. Оценили экспрессию и секрецию амфирегулина в мезенхимных стромальных клетках человека (МСК) из разных тканей. Показали, что в МСК и в ряде модельных опухолевых линий клеток человека наблюдается высокий уровень экспрессии амфирегулина, однако секреция лиганда регистрируется только в эстроген зависимых клеточных культурах.

Ключевые слова: мезенхимные стромальные клетки человека; амфирегулин; рецептор эпидермального фактора роста; пролиферация; эстроген.

Kharchenko M.V.¹, Kamentseva R.S.¹, Kosheverova V.V.¹, Kornilova E.S.^{1,2}

The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin expression and secretion in human mesenchymal stromal cells

¹ Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

² Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The expression and the secretion of amphiregulin (ErbB1 receptor ligand) in human mesenchymal stromal cells (MSCs) from different tissues were assessed. We have found that a high level of amphiregulin expression is observed in MSCs and in a number of model human tumor cell lines. Amphiregulin secretion is observed only in estradiol dependent cell cultures.

Keywords: human mesenchymal stromal cells; amphiregulin; epidermal growth factor receptor; proliferation; estradiol.

Амфирегулин (AREG) является лигандом семейства эпидермальных факторов роста (EGF) и способен связываться исключительно с ErbB1 (рецептором EGF). AREG участвует в регуляции широкого спектра биологических процессов, включая рост клеток, пролиферацию, нейрогенез, миграцию клеток. Однако роль AREG в дифференцировке различных типов клеток, а также его влияние на рост и дифференцировку МСК остаются в значительной степени неизвестными. AREG транскрибируется в виде мРНК, которая кодирует трансмембранный предшественник гликопротеина (Pro-AREG). Будучи мембранным белком-предшественником, он в основном участвует в юстакриновой передаче сигнала между соседними клетками. После протеолитического расщепления Pro-AREG высвобождает AREG в межклеточную среду. Существуют три различных уровня регуляции функционирования AREG: на уровне транскрипции, на посттранскрипционном уровне через изменение стабильности мРНК и на посттрансляционном уровне через регуляцию секреции AREG. Поэтому важно оценивать в клетках количество мРНК Pro-AREG и модификации этого белка. Мы оценили экспрессию Pro-AREG в ряде МСК (в двух линиях эндометриальных МСК (энМСК2804 и АМО), МСК из пульпы зуба (МСК-DP) и МСК из вартоновского студня) и в ряде клеток опухолевого происхождения (HeLa, MCF7, A431, A549, SK-UT1B, SK-BR3) с помощью метода полуколичественной ПЦР в реальном времени. Используемые в работе МСК схожи между собой по уровню экспрессии Pro-AREG. МСК по этому

показателю сравнимы с опухолевыми клетками HeLa и SK-UT1B и значительно уступают MCF7, A431, A549 и SK-BR3. Уровень секреции AREG оценивали в кондиционированных средах различных клеточных линий качественным ИФА. Уровень экспрессии Pro-AREG не коррелирует с уровнем секреции AREG. Высокие концентрации AREG в кондиционированных средах были обнаружены только в эндометриальных MCK и SK-BR3, клеточных линиях, зависящих от эстрогена. Известно, что феноловый красный, входящий в состав сред для культивирования клеток, обладает эстроген-подобным эффектом и может стимулировать экспрессию AREG [1]. Поэтому для того чтобы оценить влияние состава среды на секрецию AREG, эндометриальные MCK были адаптированы к среде, не содержащей феноловый красный. Значимого изменения секреции AREG при этом не выявлено. Аутокринная секреция AREG эндометриальными MCK может поддерживать пролиферативную активность клеток через Ras/MAPK, PI3K/AKT путь. В кондиционированных средах MCK-DP и MCK из вартоновского студня, A431, A549 не выявлен свободный AREG при высоком уровне его экспрессии. Таким образом, можно сделать вывод, что в этих клеточных линиях не происходит протеолиз мембранного Pro-AREG, преобладает юстакриновая передача сигнала. Также эти клеточные линии отвечают ускорением пролиферации на добавленный рекомбинантный AREG, в отличие от линий, секретирующих AREG. Особенно интересно, что в MCK экспериментально вызванное протеолитическое расщепление Pro-AREG с высвобождением AREG может изменять дифференцировку MCK [2]. Также показано, что снижение экспрессии AREG способствует патогенезу некоторых заболеваний яичников. Поэтому выяснение молекулярных и клеточных механизмов регуляции синтеза и секреции AREG в MCK актуально, особенно для разработки инновационных подходов к поддержанию женского репродуктивного здоровья [3].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-14-00335.

Список литературы

1. Berthois Y., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture // *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986. Vol. 83, N 8. P. 2496–2500. doi: 10.1073/pnas.83.8.2496
2. Li J., Wang Z., Wang J., et al. Amphiregulin regulates odontogenic differentiation of dental pulp stem cells by activation of mitogen-activated protein kinase and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathways // *Stem Cell Res Ther* 2022. Vol. 13, N 1. P. 304. doi: 10.1186/s13287-022-02971-4
3. Fang L., Sun Y.P., Cheng J.C. The role of amphiregulin in ovarian function and disease // *Cell Mol Life Sci*. 2023. Vol. 80, N 3. P. 60. doi: 10.1007/s00018-023-04709-8

Хисматуллина З.Р.¹ ✉, Мусина Л.А.², Гайнетдинов Р.Р.^{3,4}

Сетчатка крыс DAT-KO как новая экспериментальная модель ретинопатий

¹ Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

² Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

³ Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Клиника высоких медицинских технологий им. Пирогова СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

✉ hismatullinazr@mail.ru

Аннотация. У крыс линии DAT-KO, нокаутированных по гену дофаминального транспортера, выявлены ультраструктурные изменения клеток сетчатки с признаками дистрофических и деструктивных процессов, что позволяет рекомендовать крыс DAT-KO для экспериментов при разработке новых методов лечения ретинопатий.

Ключевые слова: ультраструктура сетчатки; крысы линии DAT-KO; дофаминальный транспортер; ретинопатии.

Khismatullina Z.R.¹, Musina L.A.², Gainetdinov R.R.^{3,4}

The retina of DAT-KO rats as a new experimental model of retinopathy

¹ Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

² Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

³ Institute of Translational Biomedicine, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

⁴ Saint Petersburg University Hospital, Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Ultrastructural changes of retinal cells with signs of dystrophic and destructive processes were revealed in DAT-KO rats knocked out by the dopamine transporter gene, which allows recommending DAT-KO rats for experiments in the development of new treatment methods for retinopathies.

Keywords: retinal ultrastructure; DAT-KO rats; dopamine transporter; retinopathy.

Дофамин продуцирующие нейроны и рецепторы к дофамину имеются во всех структурных образованиях глаза, в том числе и в сетчатке, являющейся «продолжением» головного мозга [1]. Сетчатка глаза у крыс линии DAT-KO, нокаутированных по гену дофаминального транспортера, еще не изучена. Установлено, что отсутствие переносчика дофамина в ткани мозга проявляется двигательной гиперактивностью и когнитивными нарушениями [2]. Цель нашего исследования — изучить ультраструктурную организацию сетчатки глаза крыс линии DAT-KO в сравнении с сетчаткой крыс линии Wistar. Методом просвечивающей электронной микроскопии была изучена сетчатки половозрелых крыс (6 месяцев) линии Wistar (4 глазных яблока) и DAT-KO (10 глазных яблок). Сетчатая оболочка глаз половозрелых крыс линии Wistar имеет строение, подобное таковой других млекопитающих, признаков патологических изменений в виде вакуолизации цитоплазмы, деструкции органелл в ней и разрушения клеток нами не выявлено. Все нейроны сетчатки, а также клетки радиальной глии между нейронами, клетки пигментного эпителия и кровеносные капилляры сетчатки имели типичную для них ультраструктуру, предполагающую правильное функционирование сетчатки. Это подтверждало большое количество характерных для сетчатки лентовидных и плоских синапсов в наружном сетчатом (плексиморфном) слое. В сетчатке половозрелых крыс линии DAT-KO в отличие от таковой крыс Wistar нами были обнаружены многочисленные признаки ультраструктурных изменений. Так, определялась пролиферация глиоцитов, которая обычно выявляется при патологии в случае разрушения нейронов [3]. Цитозоль и внутриклеточные органеллы в большинстве ганглионарных нейронов подвергались выраженной

деструкции. Очертания нейронов четко не просматривались, цитоплазма была опустошенной, очень светлой, одновременно неоднородной, ядра уменьшались в размерах. Рядом с разрушенными ганглионарными нейронами выявлялись фрагменты глиоцитов, в цитоплазме которых определялись многочисленные гетерогенные фаголизосомы. Внутренний сетчатый слой сетчатки был с признаками выраженного отека дендритов и аксонов нервных клеток. Органеллы в них и четкие синаптические контакты между нейронами в этом слое встречались очень редко. Ассоциативные нейроны внутреннего ядерного слоя подвергались выраженной деструкции. По ультраструктурным признакам нейроны не представлялось возможным дифференцировать. Тела радиальных глиоцитов выявлялись в данном слое в значительном количестве, что не характерно для нормы. В наружном сетчатом слое не выявлялись ленточные синапсы между ассоциативными и фоторецепторными нейронами, что явно указывало на нарушение правильной работы зрительного анализатора у крыс изучаемой линии [4]. Данная линия животных отличается повышенной концентрацией внеклеточного дофамина в синапсах нервной ткани вследствие генетического дефицита его переносчика [2]. Полноценно функционирующие дофаминергические сигнальные пути имеют большое значение для поддержания физиологических процессов в нервной ткани, а несбалансированная активность медиатора приводит к дисфункциям, которые вызывают дегенеративные процессы в нервной ткани [5]. Модели трансгенных животных позволяют изучать механизмы развития многих болезней человека и разрабатывать новые методы их лечения. Выявленные особенности ультраструктурной организации сетчатки крыс линии DAT-KO позволяют рекомендовать их как новую экспериментальную модель при разработке методов лечения ретинопатий.

Список литературы

1. Firsov M.L., Astakhova L.A. The role of dopamine in controlling retinal photoreceptor function in vertebrates // *Neurosci Behav Physi*. 2016. Vol. 46. P. 138–145. doi: 10.1007/s11055-015-0210-9
2. Leo D., Sukhanov I., Zoratto F., et al. Pronounced hyperactivity, cognitive dysfunctions and BDNF dysregulation in dopamine transporter knockout rats // *J. Neurosci*. 2018. Vol. 38, N 8. P. 1959–1972. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1931-17.2018
3. Pierdomenico J.Di., Martínez-Vacas A., Hernández-Muñoz D., et al. Coordinated intervention of microglial and müller cells in light-induced retinal degeneration // *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020. Vol. 61, N 3. P. 47. doi: 10.1167/iovs.61.3.47
4. Вит В.В. Строение зрительной системы человека. Одесса: Астропринт. 2003. 664 с.
5. Циркин В.И., Багаев В.И., Бейн Б.Н. Роль дофамина в деятельности мозга (обзор литературы) // *Вятский медицинский вестник*. 2010. № 1. С. 7–18. EDN: OWMEAH

Хмелевская С.А. ✉

Этические и правовые проблемы проведения исследований и терапии индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК)

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

✉ xmelevsk@mail.ru

Аннотация. Технология перепрограммирования соматических клеток и получение на ее основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) привели к появлению новых правовых и этических проблем, обусловленных, прежде всего, рисками, вызванными данной технологией. В связи с этим предлагаются меры правового и этического характера, регулирующие проведение исследований и терапии на основе ИПСК.

Ключевые слова: этическое сопровождение; правовое регулирование; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; риски применения; разработка стандартизированных протоколов; создание мер контроля.

Khmelevskaya S.A.

Ethical and legal problems of research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Faculty of Philosophy, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Somatic cells reprogramming technology and the production of induced pluripotent stem cells (iPSCs) based on it have led to the emergence of new legal and ethical problems caused primarily by the risks triggered by this technology. In this regard, legal and ethical measures are proposed to regulate the conduct of research and therapy based on iPSCs.

Keywords: ethical support; legal regulation; induced pluripotent stem cells; application risks; development of standardized protocols; creation of control measures.

Технология перепрограммирования соматических клеток и получение на ее основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) стали в центре внимания исследователей после публикации в 2006 году в журнале «Cell» статьи Т. Такахаши и С. Яманака [1]. Разработка этой технологии оказалась поворотным моментом в исследованиях стволовых клеток, так как был предложен способ получения человеческих стволовых клеток без спорного использования человеческих эмбрионов; обоснована возможность репрограммирования взрослых клеток, увеличения их потенциальности. Такие исследования стали проводиться во всем мире, включая Россию. Вместе с тем их проведение, как и разработанная на их основе терапия, потребовали правовой регуляции и моральной оценки. В российских нормативных правовых актах непосредственное упоминание об ИПСК встречается в перечне перспективных научных исследований в ракурсе создания персональных клеточных препаратов. В общем плане регулирование клеточных технологий осуществляется на основе Федерального закона от 23.06.2016 № 180-ФЗ (действующая редакция) «О биомедицинских клеточных продуктах». Однако в нем отсутствует определение стволовых клеток, не раскрыто их многообразие, в том числе касающееся ИПСК.

Давая этическую оценку проведения исследований и терапии на основе ИПСК, следует, с одной стороны, признать их исключительную значимость в лечении пациентов, создании новых лекарств, изучении болезней, развитии персонализированной медицины (источники для генерации ИПСК многочисленны и более доступны, могут быть легко получены из собственных клеток пациента, являются ценным ресурсом

регенеративной медицины для замены больных или поврежденных тканей и пр. [2]. Технология получения ИПСК решает этическую и правовую проблемы получения стволовых клеток эмбриона [3]).

С другой стороны, получение и применение ИПСК продуцируют специфические риски, создающие проблемы как этического, так и правового характера. Среди таких рисков следующие:

- риск туморогенности, онкогенности и иммуногенности ИПСК; возможность образования опухолей, полученных из трансплантатов, созданных на основе ИПСК, при этом приемлемое количество загрязняющих плюрипотентных клеток с точки зрения безопасности терапевтического трансплантата трудно определимо; отсюда проблемы их применения в клинических исследованиях и лечебной практике;

- риски, связанные с возможностью создания на основе ИПСК человеческих эмбрионов и дальнейшим незаконным и аморальным их использованием, а также химер человека и животного, межвидовых химерных животных, репродуктивного клонирования человека или генерации человеческих гамет [2];

- риск нарушения требований к технологии получения ИПСК перед их применением (в частности, важна очистка полученных дифференцированных клеток от исходных плюрипотентных клеток, поскольку даже незначительная примесь iPSCs способна при трансплантации привести к образованию опухоли (тератомы));

- риски, связанные с бурной коммерциализацией результатов технологии репрограммирования, что может подтолкнуть к широкому применению ИПСК, результаты воздействия которых на организм недостаточно изучены (объем рынка ИПСК стремительно растет, предполагается, что он достигнет \$3,29 млрд в 2024 году при совокупном годовом росте 10,8% [4]);

- риски, порожденные неопределенностью в соотношении риск/польза при использовании ИПСК (например, «после избирательного удаления плюрипотентных клеток они могут появиться вновь путем превращения дифференцированных клеток обратно в стволовые (к чему может подтолкнуть, например, гипоксия)» [5]); неопределенность поведения ИПСК после введения в организм человека или животного.

Среди этических вопросов, обусловленных технологией перепрограммирования и получения на ее основе ИПСК, можно предположить и появление таких, как посмертное зачатие с использованием, например, соматических клеток; индуцирование ооцитов из клеток XY (хромосомно мужских) или спермы из клеток XX (хромосомно женских) [5].

К настоящему времени исследователи добились значимых результатов в изучении ИПСК, и, вероятно, перечисленные выше проблемы со временем будут решены. Тем не менее уже сейчас необходимы меры правового и этического характера, регулирующие проведение исследований и терапии на основе ИПСК:

- выделение в соответствующем нормативно-правовом акте ИПСК в качестве самостоятельного вида стволовых клеток, в связи с чем важно закрепление в нем дефиниций как стволовых клеток, так и ИПСК;

- разработка и нормативное закрепление стандартизированных протоколов, касающихся выделения ИПСК;

- регулирование порядка применения ИПСК в исследовательских целях и клинической практике (например, пациент должен получать убедительную информацию об идентичности и клеточной активности введенных клеток, которые ранее были одобрены в доклиническом исследовании);

- создание мер контроля, предотвращающего реализацию ряда перечисленных ранее рисков.

В любом случае необходимы дальнейшие научные разработки, долговременные исследования и клинические испытания ИПСК.

Список литературы

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. Vol. 126, N 4. P. 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
2. Moradi S., Mahdizadeh H., Šarić T., et al. Research and therapy with induced pluripotent stem cells (iPSCs): social, legal, and ethical considerations // *Stem Cell Res Ther*. 2019. Vol. 10, N 1. P. 341. doi: 10.1186/s13287-019-1455-y
3. Богданов Д.Е. Технология биопринтинга как легальный вызов: определение модели правового регулирования // *Lex russica*. 2019. № 6(151). С. 80–91. EDN: XDKLPR doi: 10.17803/1729-5920.2019.151.6.080-091
4. Induced pluripotent stem cells (iPSC) market definition and segments. B: The Business Research Company. Режим доступа: <https://www.thebusinessresearchcompany.com/report/induced-pluripotent-stem-cell-global-market-report> Дата обращения: 20.10.2024.
5. Yamashita J.K. The pathways of pluripotent stem cells to clinical applications // *Inflamm Reg*. 2024. Vol. 44, N 1. P. 5. doi: 10.1186/s41232-024-00317-6

Хоанг Х.Т. ✉, Парамонов Б.А., Чмырёв И.В., Козяев В.А., Савинков И.Ю.

Возможности применения трековых мембран после ранней некрэктомии глубоких ожогов кожи

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

✉ huytoanhoang@gmail.com

Аннотация. Моделировали глубокие ожоги кожи у 37 крыс. После иссечения ожогового струпа в рану помещали микротрансплантаты (МТ) диаметром 4 мм и покрывали раневыми покрытиями. Изучали влагопотери, приживление МТ и скорость эпителизации. Лучшие результаты достигнуты при применении «Фолидерм» с порами 4,0 мкм.

Ключевые слова: раневые покрытия; ожоги; кожная пластика.

Hoang H.T., Paramonov B.A., Chmyrev I.V., Kozyaev V.A., Savinkov I.Yu.

Possibilities of using track-etched membranes after early necrectomy in deep skin burns

S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia

Abstract. We modeled deep skin burns in 37 rats. After excising the burn scab, 4-mm microautografts (MAG) were placed in the wound and covered with dressings. We studied moisture loss, MAG survival, and epithelialization rate. The best results were achieved with 'Foliderm' (4.0 μm pores).

Keywords: wound dressings; burns; skin graft.

Активная хирургическая тактика при лечении глубоких ожогов включает раннее радикальное иссечение ожогового струпа, после чего раневая поверхность должна «закрываться» кожей или раневыми покрытиями. Идеальной является ситуация, когда одновременно можно восстановить утраченную кожу пересадкой расщепленных кожных лоскутов. Однако в связи с запретом применения трупной кожи методы комбинированной пластики («двойных сеток») ушли в историю. Методы «экономной пластики» с использованием только аутологичной кожи не позволяют достичь значительного эффекта (коэффициент пластики 1:4). Образувавшаяся после иссечения струпа раневая поверхность требует закрытия раневыми покрытиями (РП). Такого рода РП должны обладать рядом свойств: надежно защищать раны от внешнего инфицирования; оптимизировать водный баланс в ране и обеспечивать приживление кожных лоскутов. Целью исследования является изучить возможности применения трековых мембран с различными параметрами пор поверх кожных лоскутов, пересаженных на раны после ранней некрэктомии. В исследование были включены 37 самцов беспородных крыс массой тела от 320 до 480 г. Всем животным осуществлялось моделирование ожогов IIIБ ст. на спине с помощью нагревательного устройства: контактная площадка диаметром 2 см нагревается до температуры 100°C, затем она прикладывалась к подготовленному участку кожи на 30 сек. Вокруг нанесённого ожога подшивалось пластиковое кольцо нерассасывающимся шовным материалом на всю глубину кожи с целью исключения влияния контракции кожи на скорость эпителизации и срок заживления ран. Через 1–3 суток после ожога выполнялась некрэктомия ожогового струпа до фасции с одномоментной аутодермопластикой. Со спины срезался расщепленный кожный трансплантат толщиной 0,35 мм, затем из него панчем диаметром 4 мм вырезались круглые одинаковые трансплантаты, на каждую послеоперационную рану пересаживались 4 трансплантата. Животные были разделены на 3 группы: в 1-й группе послеоперационные раны закрывались марлевыми салфетками с мазью «Левомеколь», во 2-й и 3-й

группе с этой целью использовалось раневое покрытие «Фолидерм» с порами диаметром 0,6 и 4,0 мкм соответственно. Оценка эффективности раневого покрытия проводится по критериям: сроку полного заживления ран в сутках, индексу скорости заживления ран (средняя площадь уменьшения ран в процентах в сутки), приживаемости трансплантатов (доля количества прижившихся на пересаженных трансплантатов в процентах), показателям трансэпидермальных влагопотерь с поверхности ран через раневое покрытие при каждой перевязке ($г/(ч \times м^2)$) и содержанию влаги в ране (у.е.) на 7-е, 14-е и 21-е сутки после операции, измерение которых осуществлялось посредством датчиков Tewameter® TM300 и Corneometer CM825 (Courage + Khazaka Electronic GmbH, Германия). Результаты: Средний срок полного заживления ран (в сутках), скорость заживления (%/сутки), приживаемость трансплантатов (%) в каждой группе исследования соответственно: Группа «Левомеколь» — $22,9 \pm 2,9$ (суток), $4,41 \pm 0,60$ (%/сутки), 57,29%; Группа «Фолидерм 0,6 мкм» — $20,7 \pm 2,6$ (суток), $4,90 \pm 0,64$ (%/сутки), 85,42%; Группа «Фолидерм 4,0 мкм» — $19,0 \pm 2,6$ (суток), $5,35 \pm 0,73$ (%/сутки), 92,00%. Статистически было выявлено, что «Фолидерм 0,6 мкм» и «Фолидерм 4,0 мкм» позволяют не только уменьшить срок полного заживления в среднем на 2,3 и 3,9 суток ($p < 0,05$) и ускорить скорость процесса регенерации на 11,34% и 21,32% соответственно ($p < 0,05$), но и увеличить приживаемость трансплантатов в 1,5 и 1,6 раз больше ($p < 0,05$), чем при использовании «Левомеколь». А среди модификаций «Фолидерм» наилучшие результаты показывает вариант с порами диаметром 4,0 мкм: полное заживление происходит в среднем на 1,7 суток ($p < 0,05$) быстрее, а скорость регенеративного процесса увеличивается на 8,98% ($p < 0,05$) по сравнению с «Фолидерм 0,6 мкм». Анализ динамики водных показателей групп показал, что оба варианта «Фолидерм» по сравнению с марлевой салфеткой способствуют уменьшению влагопотери из раны (в среднем на 29% и 24%), сохраняют больше влаги в ране (в среднем на 94% и 62%), тем самым предотвращают высыхание ран и создают благоприятную среду для заживления ран. «Фолидерм 4,0 мкм» пропускает влагу через себя больше, чем вариант с порами 0,6 мкм (на 9%), что под ним раневое отделяемое излишне не скапливается. Вывод: Применение раневых покрытий «Фолидерм» на основе трековых мембран после хирургической некрэктомии и последующей (на завершающем этапе операции) пересадки кожи создает оптимальные условия для течения раневого процесса. Лучшие результаты достигнуты при использовании мембран с порами диаметром 4,0 мкм, которые обеспечивают оптимальный водный баланс в ране. Ранее использовавшиеся варианты покрытия с порами 0,6 мкм, использовавшиеся ранее для лечения поверхностных ожогов и ран донорских участков тела, оказались пригодными, но менее эффективными. Все варианты РП «Фолидерм» заметно (в 1,5 раза) улучшают приживление кожных трансплантатов и ускоряют заживление ран.

Холоденко И.В.¹✉, Ким Я.С.¹, Сарыглар Р.Ю.¹, Лупатов А.Ю.¹, Холоденко Р.В.², Малов С.Л.^{1,3},
Багмет Н.Н.³, Манукян Г.В.³, Ярыгин К.Н.¹

Эффероцитоз апоптотических МСК как механизм иммуномодуляции

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», Москва, Россия

² ФГБУН Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

³ ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

✉ irkhol@yandex.ru

Аннотация. МСК проявляют терапевтические эффекты при различных патологиях. Однако механизмы, лежащие в основе регенеративного потенциала МСК, не выяснены. МСК подвергаются апоптозу после трансплантации, проявляя при этом терапевтические эффекты, включая иммуномодуляцию. Такие эффекты опосредованы эффероцитозом апоптотических МСК фагоцитирующими клетками хозяина.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; апоптоз; эффероцитоз; иммуномодуляция; эффероциты; фагоциты; иммунные клетки.

Kholodenko I.V.¹, Kim Y.S.¹, Saryglar R.Y.¹, Lupatov A.Y.¹, Kholodenko R.V.², Malov S.L.^{3,1},
Bagmet N.N.³, Manukyan G.V.³, Yarygin K.N.¹

Efferocytosis of apoptotic MSCs as a mechanism of immunomodulation

¹ Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Petrovsky Russian Research Center of Surgery, Moscow, Russia

Abstract. MSCs exhibit therapeutic effects in various pathologies. However, the mechanisms underlying the regenerative potential of MSCs are not clear. MSCs undergo apoptosis after transplantation, while exhibiting therapeutic effects, including immunomodulation. Such effects are mediated by efferocytosis of apoptotic MSCs by phagocytic host cells.

Keywords: mesenchymal stem cells; apoptosis; efferocytosis; immunomodulation; efferocytes; phagocytes; immune cells.

Среди основных механизмов терапевтического действия МСК выделяют иммуномодуляцию, опосредованную секрецией широкого спектра гуморальных факторов и внеклеточных везикул, способствующих регенерации тканей, ангиогенезу и снижению воспалительных реакций. Несмотря на то, что терапевтические механизмы МСК изучаются уже достаточно давно, единого мнения по этому поводу до сих пор не сложилось. Доказано, что трансплантированные МСК сохраняют жизнеспособность в организме реципиента в течение очень короткого времени. Например, после внутривенной трансплантации в легких и печени в течение 4–12 ч обнаруживаются только апоптотические МСК и апоптотические тельца [1]. Иммуномодулирующая и противовоспалительная функция апоптотических телец, полученных из МСК, была показана на различных животных моделях воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Таким образом, к настоящему времени сформирована концепция еще одного потенциального механизма терапевтического действия МСК через образование апоптотических телец. Несмотря на многочисленные исследования, демонстрирующие иммуномодулирующие свойства и терапевтическую эффективность апоптотических МСК, запуск сигнала

клеточной гибели и механизм апоптоза в этих клетках изучены недостаточно. Одной из основных причин апоптоза трансплантированных МСК считается взаимодействие Fas–FasL [2]. В своей работе мы показали, что МСК, выделенные из различных тканевых источников, включая печень, пуповину, плаценту, а также кожные фибробласты, устойчивы к рецептор-индуцированному апоптозу через Fas и TRAIL. С другой стороны, различные типы МСК и кожные фибробласты различаются между собой по чувствительности к индукторам, запускающим апоптоз по внутреннему пути. Апоптотические МСК и полученные из них апоптотические тельца эффективно фагоцитируются профессиональными фагоцитами, макрофагами, а также непрофессиональными фагоцитами (эффероцитами), включая сами МСК, кожные фибробласты, гепатоциты, активированные лимфоциты. Эффероцитоз апоптотических МСК опосредует различные иммуномодулирующие эффекты. Например, поглощение апоптотических МСК макрофагами приводит к их поляризации в M2 противовоспалительный фенотип и к повышенной продукции IDO, что влечет за собой подавление пролиферации активированных Т-лимфоцитов и формирование пула регуляторных Т-клеток. Фагоцитоз апоптотических МСК клетками Купфера (резидентными макрофагами печени) также индуцирует их поляризацию в противовоспалительный фенотип, что приводит к снижению продукции воспалительных цитокинов, хемокинов, являющихся хемоаттрактантами для иммунных клеток, и повышению продукции противовоспалительных цитокинов. Совместно это приводит к разрешению хронического воспаления и регенерации ткани печени [3]. Таким образом, эффероцитоз апоптотических МСК после трансплантации изменяет свойства эффероцитов, в частности меняется их фенотип и секретом, что в конечном итоге приводит к изменению их функций. Поскольку основными эффероцитами апоптотических МСК выступают макрофаги, вероятно, через них и опосредуются иммуномодулирующие эффекты МСК.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00149.

Список литературы

1. Kholodenko I.V., Gisina A.M., Manukyan G.V., et al. Resistance of human liver mesenchymal stem cells to fas-induced cell death // *Curr Issues Mol Biol.* 2022. Vol. 44, N 8. P. 3428–3443. doi: 10.3390/cimb44080236
2. Kholodenko I.V., Kholodenko R.V., Majouga A.G., et al. Apoptotic MSCs and MSC-derived apoptotic bodies as new therapeutic tools // *Curr Issues Mol Biol.* 2022. Vol. 44, N 11. P. 5153–5172. doi: 10.3390/cimb44110351
3. Kholodenko I.V., Yarygin K.N. Hepatic macrophages as targets for the MSC-based cell therapy in non-alcoholic steatohepatitis // *Biomedicines.* 2023. Vol. 11, N 11. P. 3056. doi: 10.3390/biomedicines11113056

Хотин М.Г. ✉, Горячая Т.С., Шатрова А.Н., Михайлова Н.А.

Платформа для разработки и производства клеточных линий биомедицинского назначения

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ khotin@incras.ru

Аннотация. Применение в медицине продуктов на основе культивируемых клеток или их компонентов предполагает использование клеточных линий биомедицинского назначения. Создание подобных линий в рамках системы биобанков и клеточных коллекций требует применения новых стандартов, соответствующих системе GXP.

Ключевые слова: коллекция клеток; биомедицина; клеточные продукты; производство GMP; высокотехнологические лекарственные средства.

Khotin M., Goryachaya T., Shatrova A., Mikhailova N.

Platform for the development and production of biomedical cell lines

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Application of products based on cultured cells or their components in medicine involves the use of specified biomedical cell lines. The creation of such lines within the framework of a system of biobanks and cell collections requires the use of new standards that comply with the GXP system.

Keywords: cell collection; biomedicine; cell products; GMP production; high-tech biomedicines.

Коллекции культивируемых клеток, объединенные в специализированные банки, развиваются с первой половины XX века. Их предназначение — обеспечение научных исследований и разработок стандартизованными образцами клеточных линий, применение которых необходимо для воспроизводимости результатов. С прогрессом биомедицинских технологий возникла необходимость в создании новых типов клеточных банков. Эти банки содержат клеточные линии, которые можно использовать для создания медицинских продуктов. Отличие заключается в ином уровне требований к безопасности, что определяется их предназначением — применением для лечения человека. При производстве подобных линий необходимо внедрять систему надлежащей производственной практики (GMP). Лаборатории, в которых проводится работа по получению клеток, их масштабированию, паспортизации и криохраниению, должны быть объединены в производство, которое, в свою очередь, должно соответствовать требованиям законодательства. В Российской Федерации и на территории ЕАЭС на сегодня это требования к производствам высокотехнологических лекарственных средств и их соответствию системе GMP.

Более 50 лет назад в Институте цитологии РАН (ИНЦ РАН) по инициативе и под руководством профессора Г.П. Пинаева была создана первая в стране коллекция культур клеток. Сегодня это «Коллекция культур клеток позвоночных» и базовый репозиторий Российской коллекции типовых клеточных культур (РКТКК). Понимая значимость создания клеточных линий биомедицинского назначения и имея богатый опыт разработки клеточных продуктов, в ИНЦ РАН в рамках работ по формированию РКТКК создан раздел коллекции «Клетки биомедицинского назначения». Для работ с такими клеточными линиями используется инфраструктура опытного производства клеточных продуктов ИНЦ РАН — чистые помещения, оснащенные роботизированным оборудованием для клеточного процессинга.

Для получения таких клеточных линий нами разрабатывается технологическая платформа, которая должна гибко адаптироваться под основные клеточные типы, используемые в биомедицине.

Разрабатываемая технологическая платформа должна обеспечивать максимальную стандартизацию всех процессов с целью увеличения качества и воспроизводимости продукции — в данном случае получаемых клеточных линий. Важным параметром при разработке технологий банков клеток биомедицинского назначения является экономическая составляющая, а именно снижение затрат и одновременное увеличение количества получаемых клеток в один производственный цикл.

Дермальные фибробласты человека линии DFFh стали первой клеточной линией в создаваемой Коллекции клеток биомедицинского назначения. Она была получена с использованием разработанной нами производственной технологии, которая оформлена в серию стандартных операционных процедур и методик.

При переходе от лабораторного протокола к производству, от банка клеток для научно-исследовательских целей к коллекции клеток биомедицинского назначения мы были вынуждены адаптировать и отрабатывать фактически все параметры работы с клетками. Для этого были проведены соответствующие исследования. Так, было необходимо разработать производственную методику культивирования и адаптировать её для роботизированной станции. Также были проведены серии экспериментов, направленных на сокращение негативного влияния криофиликтика, а значит, времени всех процедур и одновременное увеличение объема серии (криоампул).

Проведен сравнительный анализ влияния питательных сред на следующие параметры, характеризующие состояние клеток в культуре: морфология, индекс пролиферации, автофлуоресценция и прямое светорассеяние, % живых клеток в разной конfluентности. Были исследованы питательные среды DMEM производства Himedia (Индия), Servicebio (Китай), Биолот (Россия), BioinnLabs (Россия) (торговое название среды DMEM), Gybco (США). Дермальные фибробласты линии DFFh (PKTKK, Россия) культивировали с использованием вышеперечисленных питательных сред и с добавлением 10% FBS (Gybco, США) в течение 24 и 120 часов. Наилучшие показатели жизнеспособности, пролиферации по совокупности оцениваемых параметров показали клетки, которые выращивали на средах DMEM, производства BioinnLabs и Gybco. Принимая во внимание экономическую составляющую и надежность поставок, нами была выбрана среда DMEM (BioinnLabs, Россия) для дальнейшей работы и включения в технологические регламенты.

При производстве продуктов на основе секрета клеток используют клеточные линии биомедицинского назначения. Свойства этих линий по синтезу различных компонентов могут отличаться. Мы считаем полезным проводить описание состава секрета таких клеточных линий и вносить эти параметры в состав паспорта.

Формирование регенеративной медицины как отрасли тесно связано с развитием клеточных банков биомедицинского назначения. Необходимо разрабатывать новые клеточные линии МСК и фибробластов. Такие клеточные линии могут использоваться производителями и разработчиками как готовое «сырье» с гарантированным качеством. Предложенный подход сократит затраты и время как на разработку, так и на производство биомедицинских продуктов на основе культивируемых клеток.

Работа поддержана грантом Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2021-1063).

Храмцова Е.А.¹, Петронюк Ю.С.¹, Антипова К.Г.², Азиева А.М.², Пацаев Т.Д.², Григорьев Т.Е.^{2,3} ✉

Анализ изменения упругих свойств, объемной микроструктуры и геометрии нетканых матриц на основе полилактида

¹ Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

✉ timgrigo@yandex.ru

Аннотация. Представлены результаты исследования волокнистых матриц на основе полилактида, функционализированных коллагеном и хитозаном. Акустическая микроскопия позволила визуализировать объемные изменения и количественно оценить упругие свойства образцов на этапах созревания ТИК и гидролиза матриц.

Ключевые слова: акустическая микроскопия; регенеративная медицина; полилактид; электроспиннинг; хитозан; коллаген; тканеинженерная конструкция.

Khramtsova E.A.¹, Petronyuk J.S.¹, Antipova K.G.², Azieva A.M.², Patsaev T.D.², Grigoriev T.E.^{2,3}

Analysis of changes in elastic properties, volumetric microstructure and geometry of non-woven matrices based on polylactide

¹ IBCP RAS, Moscow, Russia

² NRC “Kurchatov institute”, Moscow, Russia

³ MIPT, PHYSTECH, Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

Abstract. The results of the study of fibrous matrices based on polylactide, functionalized with collagen and chitosan are presented. Acoustic microscopy allowed visualization of volumetric changes and quantitative assessment of elastic properties of samples at the stages of maturation of TEC and hydrolysis of matrices.

Keywords: acoustic microscopy; regenerative medicine; polylactide; electrospinning; chitosan; collagen; tissue engineering construct.

В регенеративной медицине лидирующим является изготовление объемных матриц и тканеинженерных конструкций (ТИК), что отражает естественный переход от 2D-систем к более сложным — 3D, соответствующим нативной среде обитания клеток. Кроме объемной микроструктуры, полученный 3D-матрикс должен обладать рядом других свойств: биосовместимостью, нетоксичностью, биodeградируемостью, соответствием механических свойств матриксу нативной ткани, и эти свойства искусственный матрикс должен сохранять до замены его на собственный внеклеточный матрикс. Доказано, что формование матрикса в виде высокопористой структуры с маленькой толщиной стенок и взаимопроникающими порами позволяет добиться сохранения его механических свойств на максимально долгий срок за счет исключения автокаталитических реакций в объеме [1].

Поли(L-молочная кислота) (ПЛА) представляет собой биоразлагаемый материал с большим потенциалом для использования в биомедицинских целях. Однако его гидрофобность, низкая гидролизуемость и плохая адгезия клеток в некоторых случаях вызывает сложности; таким образом, требуется разработка улучшенных материалов на основе ПЛА. Сообщалось о некоторых методах модификации поверхности ПЛА: обработка щелочью, ферментативная обработка, плазменные методы, покрытие гидрофильным полимером и сшивание белками, альгинатом и хитозаном [2].

В работе представлены результаты исследования нетканых матриксов на основе ПЛА, полученных методом электроспиннинга, как чистых, так и функционализированных коллагеном и хитозаном. Модификацию проводили с использованием 0,5 масс % раствора хитозана и 0,25 масс % раствора коллагена для достижения одинаковой вязкости раствора и одинаковой степени пропитки ими. Было установлено, что неориентированные нетканые маты позволяют задерживать раствор модификатора в объеме и на поверхности благодаря образованию углов и пересечений между волокнами [3].

Параллельно проводилось два эксперимента: сравнение изменения объемных характеристик с течением времени под действием гидролиза и гидролиза в совокупности с размножением клеточной линии в объеме матрикса на сроке 0–12 недель. Клеточная линия НЕК293 была выбрана из-за ее простоты манипулирования и природы, а также потому, что она считается эпителиальным типом. Разрабатываемые нетканые материалы планируются к широкому применению, в том числе для закрытия кожных ран и ожогов.

Основным методом исследования в данной работе является акустическая микроскопия. Данный метод обладает рядом преимуществ в области регенеративной медицины: неинвазивность, бесконтактность, возможность исследовать ТИК в культуральной среде, высокое разрешение, получение визуальных изображений объемной микроструктуры и геометрии образцов с одновременным количественным анализом скорости звука и затухания в объеме. Полученные данные были проанализированы в соответствии с данными механического нагружения и электронной микроскопии.

Установлено, что для композитных матриксов в процессе гидролиза решающими факторами являются природа и концентрация функционализирующей добавки: за счет этого регулируется скорость и величина набухания композита. Так, например, максимум набухания у композитов, модифицированных коллагеном, наступает на 8-й неделе, а с модификацией хитозаном — на 4-й неделе. При этом пропорционально меняются скорость звука и затухание. Наличие клеточного компонента и увеличение его концентрации с течением времени оказывает дополнительное влияние на эти параметры. Показано, что к 12-й неделе наибольший клеточный рост произошел на образцах нетканых матриксов ПЛА, функционализированных хитозаном, что существенно увеличило толщину ТИК (более чем в два раза) и повлияло на скорость звука и затухание, но в меньшей степени, что коррелирует с ультразвуковыми свойствами клеток, близкими к культуральной среде.

Акустическая микроскопия показала высокую чувствительность к изменению в скорости звука и затухания в процессе гидролиза матриксов и созревания ТИК. Возможность бесконтактно визуализировать как отдельные волокна в объеме полностью сформированного ТИК, так и изменение размеров и геометрии всего образца является неоспоримым преимуществом ультразвуковой микроскопии и мощным инструментом по изучению созревания ТИК и подготовки его к имплантации.

Благодарность:

Разработка материалов была проведена в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский институт», ультразвуковые исследования выполнены в рамках Государственного задания ИБХФ РАН номер темы 44.8.

Список литературы

1. Трофимчук Е.С., Поцелеев В.В., Хавпачев М.А., и др. Пористые материалы на основе полилактида: получение, особенности гидролитической деструкции и области применения // Высокомолекулярные соединения. Серия С. 2021. Т. 63, № 2. С. 190–211. EDN: EKILDJ doi: 10.31857/S2308114721020102
2. Furuie T., Nagahama H., Chaochai T., et al. Preparation and characterization of chitosan-coated poly(L-lactic acid) fibers and their braided rope // *Fibers* 2015. Vol. 3, N 4. P. 380–393. doi: 10.3390/fib3040380
3. Genchi G.G., Ciofani G., Polini A., et al. PC12 neuron-like cell response to electrospun poly(3-hydroxybutyrate) substrates // *J Tissue Eng Regen Med*. 2015. Vol. 9, N 2. P. 151–161. doi: 10.1002/term.1623

Хусаинова Л.А. ✉, Норкин Р.Р., Яныгина Л.М., Пономарев А.С., Ризванов А.А.

Сравнительная характеристика базальных и дифференцированных кератиноцитов и первичных человеческих фибробластов по эпидермальным маркерам

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

✉ leysan.khusainova.18@mail.ru

Аннотация. Ламеллярный ихтиоз — дерматологическое заболевание, вызванное мутацией гена TGM1, приводящее к гиперкератозу и воспалению кожи. В исследовании оценили экспрессию эпидермальных маркеров у кератиноцитов и фибробластов. Результаты подтвердили более высокую экспрессию в дифференцированных кератиноцитах.

Ключевые слова: хроническая дерматологическая патология; дефицит фермента TGM1; мутация гена TGM1; иммуноцитохимический анализ; экспрессия маркеров.

Khusainova L.A., Norkin R.R., Yanygina L.M., Ponomarev A.S., Rizvanov A.A.

Comparative characteristics of basal and differentiated keratinocytes and primary human fibroblasts by epidermal markers

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Lamellar ichthyosis is a dermatological disease caused by a mutation in the TGM1 gene, leading to hyperkeratosis and skin inflammation. The study examined epidermal marker expression in keratinocytes and fibroblasts, confirming higher levels in differentiated keratinocytes.

Keywords: chronic dermatological pathology; TGM1 enzyme deficiency; TGM1 gene mutation; immunocytochemical analysis; marker expression.

Ламеллярный ихтиоз представляет собой тяжелую хроническую дерматологическую патологию, характеризующуюся нарушением барьерной функции эпидермиса, что приводит к выраженному гиперкератозу, шелушению кожи и воспалительным процессам, связанным с дефицитом фермента TGM1, обусловленным мутацией гена TGM1. Осложнения, вызванные этим заболеванием, могут негативно влиять на физическое развитие и рост ребенка, особенно в раннем возрасте, из-за нарушения терморегуляции. Помимо этого, увеличивается риск кожных суперинфекций и потери жидкости через кожу, что может привести к сепсису и фатальным исходам. Перспективным подходом в терапии является генетическая модификация, направленная на восстановление активности фермента TGM1 посредством коррекции соответствующего гена. В данном исследовании было проведено сравнение экспрессии эпидермальных маркеров у базальных и дифференцированных кератиноцитов (HaCaT) и фибробластов человека с помощью иммуноцитохимического анализа. Оценивалась экспрессия CK5, CK10, CK14 (цитокератины 5, 10, 14), TGM1 (трансглутаминаза 1), FLG (филлагрин), DSG3, p63. Иммуноцитохимия проводилась на монослойных культурах и оценивалась с помощью конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Для сравнения групп использовалось среднее значение флуоресценции. Количественная оценка флуоресценции маркеров базальных и дифференцированных HaCaT на 6-й день показала различия по маркерам TGM1, CK14. Они оказались выше в дифференцированных клетках. Маркеры базальных клеток CK5, p63 повысились в базальных кератиноцитах, культивируемых в бескальциевой среде. При сравнении дифференцированных кератиноцитов

с фибробластами экспрессия белка СК5 была выше на 49,2% в фибробластах, при этом экспрессия белков СК14, р63, FLG, TGM1, DSG3 была выше у кератиноцитов на 41,8%, 76,8%, 47,5%, 52,7%, 8% соответственно. Таким образом, продемонстрировано, что большинство из изученных маркеров экспрессируются значительно выше в дифференцированных кератиноцитах человека, чем в фибробластах. При этом экспрессия маркеров СК5 и р63 была выше в базальных кератиноцитах, что соответствует литературным данным.

Хуцистова А.О.^{1,2} ✉, Розанов В.В.^{1,3}, Матвейчук И.В.³, Черняев А.П.^{1,4}

Актуальные научные исследования в области радиационной стерилизации костных имплантатов

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена — филиал ФГБУ филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Москва, Россия

³ Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт ядерной физики имени Д.В. Скобельцына Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ khucistova.ao17@physics.msu.ru

Аннотация. Современные научные исследования в области радиационной стерилизации костных имплантатов направлены на оптимизацию методов их обработки с целью повышения их эффективности при минимальном негативном воздействии на структуру, биомеханические, индуктивные и кондуктивные характеристики образцов.

Ключевые слова: костные имплантаты; стерилизация; радиационные технологии.

Khucistova A.O.^{1,2}, Rozanov V.V.^{1,3}, Matveychuk I.V.³, Chernyaev A.P.^{1,4}

Current scientific researches in the field of radiation sterilization of bone implants

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute of the Federal State Budgetary Institution “National Medical Research Radiological Centre” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

³ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, Moscow, Russia

⁴ Skobeltsyn Institute of Nuclear Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Modern scientific research in the field of radiation sterilization of bone implants focuses on optimizing their processing methods in order to increase their efficiency with minimal negative impact on the structure, biomechanical, inductive and conductive characteristics of the samples.

Keywords: bone implants; sterilization; radiation technologies.

Возрастающая потребность практической медицины в качественном костно-пластическом материале требует от исследователей и разработчиков постоянного совершенствования методик и технологий его изготовления. Это в полной мере касается и проблемы обеспечения высокой степени стерильности используемых костных имплантатов при минимальном негативном воздействии на их структуру, биомеханические, индуктивные и кондуктивные характеристики [1, 2].

Одним из наиболее перспективных и эффективных методов стерилизации костных имплантатов являются радиационные технологии. Использование ионизирующего излучения при обработке изделий медицинского назначения занимает сегодня примерно половину рынка стерилизации, включая применение радиоизотопов Co-60 и Cs-137, испускающих гамма-лучи, ускорителей электронов и рентгеновских лучей от рентгеновских трубок и промышленных ускорителей. Основные различия в приведенных способах радиационной обработки в наибольшей степени связаны с мощностью дозы, временем воздействия и глубиной проникновения [2, 3].

Известно, что источник с кобальтом-60 излучает изотропно, в то время как поток электронов и рентгеновские лучи имеют выраженную пространственную анизотропию в направлении обрабатываемого продукта.

Таким образом, при равном флюенсе электронов и гамма-квантов мощность дозы первых значительно выше по сравнению с гамма-излучением, что, в свою очередь, определяет малое время экспозиции для стерилизации электронами (до нескольких минут) и продолжительное для стерилизации с помощью радиоизотопов (примерно сутки). Однако электроны, в отличие от гамма-лучей, характеризуются малой величиной длины свободного пробега в костной ткани, что приводит к большей неравномерности распределения поглощенной дозы по всей глубине мишени. Рентгеновское излучение обладает «промежуточными» свойствами электронов и гамма-лучей: продолжительность обработки в данном случае составляет несколько часов, а глубина проникновения сравнима с гамма-излучением. Степень равномерности распределения дозы может быть определена с помощью коэффициента однородности, вычисляемого как отношение минимальной поглощенной дозы к максимальной. Данная величина оптимизирует соблюдение дозы, предписанной для стерилизации, и поддержание максимальной дозы, поддерживаемой продуктом [3].

Для повышения качества процесса стерилизации можно использовать дополнительные меры, такие как облучение продукта с двух сторон, варьирование геометрических параметров, применение различных модификаторов, которые позволяют достичь оптимального пространственного распределения дозовой нагрузки по всему объему образца с приемлемой максимальной дозой [3]. Существенную роль в выработке практических рекомендаций для реализации таких подходов наряду с лабораторными исследованиями могут играть результаты компьютерного моделирования.

Необходимо отметить, что нарушения морфологических и механических характеристик наблюдаются с 15 кГр, несмотря на то, что МАГАТЭ принята величина поглощенной дозы для стерилизации костных имплантатов, составляющая 25 кГр. Таким образом, даже при выполнении всех установленных протоколом требований и условий радиационной обработки костных имплантатов исход операции по пересадке костного материала может оказаться негативным. В связи с этим разработаны и продолжают совершенствоваться комбинированные методы стерилизации, предполагающие двухэтапное воздействие на материал. На первом этапе используется предварительное воздействие стерилизующего фактора, не связанного с ионизирующим излучением, на втором — радиационная обработка с достижением положительного синергетического эффекта [2].

В настоящее время предложены и запатентованы две оригинальные технологии: в одной на первом этапе используется водный раствор химических реагентов и гамма-излучение на втором [4], в другой образцы костной ткани сначала подвергаются воздействию озono-кислородной смеси, после чего облучаются электронами на линейном ускорителе с энергией 1 МэВ [5]. При этом в обоих случаях удается снизить величину поглощенной дозы до 11–12 кГр с необходимым уровнем стерильности объектов. Важной особенностью второй из описанных технологий является способность озона инактивировать патогены даже в спорной форме, что не всегда удается достичь при селективном радиационном воздействии.

В современных условиях, когда радиационные технологии убедительно доказали свою эффективность в радиационной стерилизации объектов биомедицинского назначения, представляется перспективным дальнейшее развитие их именно в направлении использования комбинированных методик, эффективно использующих сочетанное воздействие различных факторов и источников радиационного воздействия. Это может быть и микроволновое, и ИК, и ультрафиолетовое излучение в сочетании как с электронами, так и с рентгеном. Каждая комбинация потребует выработки своего научно-обоснованного технологического режима в каждом конкретном применении для обеспечения необходимого уровня всех компонентов качества изготавливаемых костных имплантатов.

Список литературы

1. Cheria M., Mock C. The global burden of musculoskeletal injuries: challenges and solutions // *Clin Orthop Relat Res*. Vol. 466, N 10. P. 2306–2316. doi: 10.1007/s11999-008-0416-z
2. Розанов В.В., Матвейчук И.В. Современное состояние и перспективные инновационные направления развития способов стерилизации биоимплантатов // *Альманах клинической медицины*. 2019. Т. 47, № 7. С. 634–646. EDN: QDHYWR doi: 10.18786/2072-0505-2019-47-063
3. Radiation Sterilization in Tissue Banking. В: IAEA [Internet]. Режим доступа: https://humanhealth.iaea.org/HHW/RadiationOncology/RadiationBiology/Radiation_Sterilization/index.html Дата обращения: 20.10.2024.

4. Патент РФ № 2356224 / 27.05.2009. Савельев В.И., Булатов А.А., Рыков Ю.А. Комбинированный способ стерилизации костных трансплантатов. EDN: WDEWPG
5. Патент РФ № 2630464 / 08.09.2017. Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К., и др. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов. EDN: PISSHF

Цвелая В.А.¹⁻³ ✉, Бережной А.К.¹, Синицына А.П.¹, Семидетнов И.С.¹, Наумов В.Д.¹, Слотвицкий М.М.¹⁻³

Моделирование диагностических платформ с помощью совмещенных *in silico* методов и тканевой инженерии сердца

¹ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

³ Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия

✉ vts93@yandex.ru

Аннотация. В работе нам удалось создать и валидировать новую совместную *in vitro* и *in silico* тестовую систему на основе hiPSC-СМ, включающую компьютерную клеточную модель монослоя, которая позволяет однозначно интерпретировать про- и антиаритмогенные эффекты веществ.

Ключевые слова: iPSC; тканевая инженерия; кардиотоксичность; скрининговые системы; аритмии.

Tsvelaya V.A.¹⁻³, Berezhnoy A.K.¹, Sinitsyna A.P.¹, Semidetnov I.S.¹, Naumov V.D.¹, Slotvitsky M.M.¹⁻³

Advanced cardiovascular toxicity screening: integrating human iPSC-derived cardiomyocytes with *in silico* models

¹ Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia

² ITMO University, Saint Petersburg, Russia

³ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

Abstract. In this work, we managed to create and validate a new joint *in vitro* and *in silico* test system based on hiPSC-CM, including a computer cell model of a monolayer, which allows for an unambiguous interpretation of pro- and antiarrhythmogenic effects of substances.

Keywords: iPSC; tissue engineering; cardiotoxicity; screening systems; arrhythmias.

Фармацевтическая промышленность развивается, используя кардиомиоциты, полученные из hiPSC (hiPSC-СМ), для скрининга сердечной безопасности *in vitro*. Традиционная зависимость от удлинения интервала QT как основного маркера кардиотоксичности подвергается сомнению. Инициатива Comprehensive *In vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) предлагает включить компьютерное моделирование и платформы *in silico* для более комплексного подхода к тестированию кардиотоксичности, наряду со скринингом hiPSC-СМ *in vitro* [1]. В нашем исследовании представлена инновационная платформа, которая объединяет тестирование распространения hiPSC-СМ *in vitro* с моделями *in silico* для оценки кардиотоксичности [2]. Анализируя электрофизиологические и морфологические характеристики hiPSC-СМ, мы проводим тщательную оценку потенциальных кардиологических рисков, вызванных лекарственными средствами, с помощью компьютерного моделирования. Используя лидокаин и другие антиаритмические препараты в качестве примеров, мы демонстрируем, что, используя интегрированную экспериментальную и компьютерную платформу, можно точно предсказать клинические проявления побочных эффектов заранее.

Список литературы

1. Sakamoto K., Sakatoku K., Sugimoto S., et al. Continued exposure of anti-cancer drugs to human ips cell-derived cardiomyocytes can unmask their cardiotoxic effects // J Pharmacol Sci. 2019. Vol. 140, N 4. P. 345–349. doi: 10.1016/j.jphs.2019.08.005
2. Slotvitsky M., Tsvelaya V., Frolova S., et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer // Toxicological Sci. 2019. Vol. 168, N 1. P. 70–77. doi: 10.1093/toxsci/kfy274

Цеомашко Н.Е. ✉, Абидова А.Д.

Новые композиции на основе коллагена и растительных добавок для регенеративной и заместительной медицины

Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр психического здоровья, Институт химии растительных веществ, Ташкент, Узбекистан

✉ tsne_77@list.ru

Аннотация. Созданы различные композиции раневых покрытий (РП) путем добавления к коллагену растительных компонентов — флавоноидов кверцетина и рутина из *Saphora japonica*, алкалоида филальбин из растений рода *Convolvulus* и экстракта из *Rumex confertus*. Ранозаживляющую активность новых композиций изучали на моделях ожоговых ран. Установлено, что многокомпонентная композиция на основе бычьего коллагена с кверцетином, рутином и филальбином является наиболее эффективной и ускоряет заживление ран в 1,49 раза быстрее по сравнению с коммерческим РП «NeuSkin-F».

Ключевые слова: композиции раневых покрытий; коллаген; кверцетин; рутин; филальбин; ранозаживление; адгезия; конгруэнтность.

Tseomashko N.E., Abidova A.D.

New compositions based on collagen and plant additives for regenerative and replacement medicine

Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Mental Health, Institute of Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan

Abstract. Various compositions of wound dressings (WD) have been created by adding plant components to collagen — the flavonoids quercetin and rutin from *Saphora japonica*, the alkaloid philalbine from plants of the genus *Convolvulus* and extract from *Rumex confertus*. The wound-healing activity of new compositions was studied on models of burn wounds. It has been established that a multicomponent composition based on bovine collagen with quercetin, rutin and philalbin is the most effective and accelerates wound healing 1.49 times faster compared to the commercial WD “NeuSkin-F”.

Keywords: wound dressing compositions; collagen; quercetin; rutin; philalbin; wound healing; adhesion; congruence.

Коллаген — один из самых распространенных белков в нашем организме, а потому наиболее подходящий для создания композиций для регенеративной и заместительной медицины. Коллаген выделяли из сухожилий хвостов крупного рогатого скота (КРС) и крыс методом ферментно-кислотной экстракции [1]. Растительные компоненты добавляли в коллагеновый гель перед полимеризацией физическим методом *ex situ* в различных дозах и сочетаниях. Также в пленки добавляли 1% глицерина для повышения эластичности раневых покрытий плёночного типа (РП). Для проведения сравнительного анализа ранозаживляющей активности были получены следующие новые композиции РП: RC-Rc — крысиный коллаген с экстрактом полифенольных соединений из *Rumex confertus*; RC-K-Ru — крысиный коллаген с флавоноидами (кверцетином и рутином) из *Saphora japonica*; RC-K-Ru-F — крысиный коллаген с флавоноидами *Saphora japonica* и алкалоидом филальбином из растений рода *Convolvulus*; CC-Rc — бычий коллаген с экстрактом из *Rumex confertus*; CC-K-Ru — бычий коллаген с флавоноидами из *Saphora japonica*; CC-K-Ru-F — бычий коллаген с флавоноидами *Saphora japonica* и алкалоидом филальбином; RC и CC — коллагеновые плёнки из сухожилий хвостов крыс и КРС без добавок. В качестве антимикробных, противовоспалительных и антиоксидантных компонентов в композиции РП добавляли флавоноиды из *Saphora japonica* и экстракта из *Rumex confertus*

в активных дозах 150 и 50 мкг/мл соответственно. В качестве пролифератора роста клеток фибробластов использовали алкалоид филлальбин из растений рода *Convolvulus* в концентрации 12,5 мкг/мл [2]. Специфическую активность РП оценивали на моделях термических ожогов IIIA степени на 100 крысах. Раны наносили медной пластиной размером 1,75×1,75 см, закреплённой на паяльном устройстве, что позволяло вызвать у животных однотипные по размерам и глубине ожоги. Струпы снимали 40% салициловой кислотой, промывали физраствором и наносили РП. Для сравнения использовали коммерческое РП на основе коровьего коллагена — «NeuSkin-F» (Euc. Pharm.Ltd, Индия). Установлено, что для полной эпителизации экспериментальных ожоговых ран без вмешательства человека крысам потребовалось 25,4–26,2 суток, в то время как терапия ран композициями РП на основе коллагена сократила сроки полной эпителизации ран до 17,4–21,1 суток. При этом наиболее эффективными оказались РП на основе коллагена, выделенного из сухожилий КРС со всем комплектом растительных добавок. Затем по эффективности шли композиции на основе крысиного коллагена с добавками и коммерческий препарат. РП на основе коллагена с растительными добавками в 1,45 раз сокращают сроки заживления ран, за счёт введения экзогенного коллагена — матрикса для фибробластов, за счёт антиоксидантных, противовоспалительных и антимикробных свойств растительных компонентов, что приводит к значительному сокращению фазы воспаления, кроме того, филлальбин стимулирует пролиферативную активность фибробластов, а кверцетин и рутин улучшают микроциркуляцию крови и очистку ран от нежизнеспособных тканей, от активных форм кислорода, что ускоряет процесс миграции фибробластов и их пролиферацию, стягивание раны. Введение экзогенного коллагена с биодобавками обеспечивает скорую ликвидацию тканевого дефекта и прочность формирующегося рубца, о чем свидетельствуют данные гистоморфологии рубцовых тканей. При этом коммерческий препарат сравнения «NeuSkin-F» (Eucare Pharmaceuticals (P) Limited, India), состоящий из коллагена без лекарственных добавок, показал очень низкие ранозаживляющие свойства (полное заживление только на 22,5±0,4 сутки), но мы полагаем, что только из-за плохой адгезивности данного препарата. Известно, что при нанесении «NeuSkin-F» на раневое ложе при использовании в клинике его фиксируют дополнительными повязками. В этой связи наши РП, обладающие в значительной степени лучшей конгруэнтностью и адгезией на рану, показывают превосходный результат и не требуют дополнительной фиксации. Таким образом, в результате проведённых исследований наибольшей специфической (ранозаживляющей) активностью обладают следующие композиции РП в порядке убывания эффекта: СС-К-Ru-F, СС-К-Ru, СС-Rc, RC-К-Ru-F, RC-К-Ru, RC-Rc и коммерческий препарат NeuSkin-F.

Список литературы

1. Tseomashko N.E., Tretyakova A.N., Vasil'kov A.Y. Preparation and physicochemical properties of collagen for wound dressings // Chem Nat Compd. 2024. Vol. 60. P. 688–692 doi: 10.1007/s10600-024-04412-5
2. Tseomashko N.E., Terent'eva E.O., Kodirova D.B., et al. Synthesis of convolinine and cytotoxic activity of alkaloids of the genus *Convolvulus* and their derivatives // Chem Nat Compd. 2013. Vol. 48. P. 1039–1041. doi: 10.1007/s10600-013-0459-6

Цеомашко Н.Е.^{1,2} ✉, Хашимова З.С.², Азимова Ш.С.²

Применение культур клеток для поиска безопасных пролифераторов для регенеративной медицины и косметологии

¹ Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр психического здоровья, Ташкент, Узбекистан² Институт химии растительных веществ, Ташкент, Узбекистан

✉ tsne_77@list.ru

Аннотация. Фитостероиды экдистерон из *Rhaponticum carthamoides*, туркестерон из *Ajuga Turkestanica* и сумма фитостероидов из *Ajuga Turkestanica* — «Аюстан» — изучены на способность ингибировать и стимулировать рост нормальных клеток фибробластов и клеток карциномы шейки матки (HeLa) и гортани (HEp-2) методом МТТ. Установлено, что туркестерон стимулирует пролиферацию всех типов клеток, и особенно клеток рака гортани (на 44–63%). Экдистерон ингибирует рост раковых клеток и избирательно стимулирует пролиферацию только фибробластов на 30–80% с пиком пролиферации при 12,5 мкг/мл.

Ключевые слова: экдистерон из *Rhaponticum carthamoides*; туркестерон и «Аюстан» из *Ajuga Turkestanica*; фибробласты; безопасный пролифератор.

Tseomashko N.E.^{1,2}, Khashimova Z.S.², Azimova Sh.S.²

Application of cell cultures to search safe proliferators for regenerative medicine and cosmetology

¹ Republican Specialized Scientific and Practical Medical Center for Mental Health, Tashkent, Uzbekistan² Institute of Chemistry of Plant Substances, Tashkent, Uzbekistan

Abstract. The phytosteroids ecdysterone from *Rhaponticum carthamoides*, turkesterone from *Ajuga Turkestanica* and the sum of phytosteroids from *Ajuga Turkestanica*, “Ayustan”, were studied for their ability to inhibit and stimulate the growth of normal fibroblast cells and cervical (HeLa) and laryngeal (HEp-2) carcinoma cells using the MTT method. It has been established that turkesterone stimulates the proliferation of all types of cells, and especially laryngeal cancer cells (by 44–63%). Ecdysterone inhibits the growth of cancer cells and selectively stimulates the proliferation of fibroblasts by 30–80% with a proliferation peak at 12.5 µg/ml.

Keywords: ecdysterone from *Rhaponticum carthamoides*; turkesterone and “Ayustan” from *Ajuga Turkestanica*; fibroblasts; safe proliferator.

Фитостероиды обладают широким спектром физиологического действия, однако данных о способности стимулировать и ингибировать рост нормальных и раковых клеток крайне мало и они неоднозначные. Например, фитостероиды 20-гидроксиэкдизон и α-экдизон стимулируют рост не только нормальных клеток, но и опухолевых [1]. Учитывая, что фитостероиды активно используются в медицине, спортивном питании и косметологии, например, фитостероиды из *Ajuga Turkestanica* как пролифераторы кератиноцитов включены в состав косметических средств «Гидра Мов» (Christian Dior) [2], мы считаем необходимыми исследования воздействий различных фитостероидов на клетки и оценку их безопасности для использования. Для наших исследований были выбраны два индивидуальных соединения — экдистерон из растения *Rhaponticum carthamoides* и туркестерон из растения *Ajuga Turkestanica*, а также сумма фитостероидов из *Ajuga Turkestanica* — препарат «Аюстан», полученных химиками в Институте химии растительных веществ Академии Наук Республики Узбекистан. В работе использованы верифицированные культуры клеток карциномы шейки матки (HeLa) и гортани (HEp-2), полученные из банка клеточных культур Института

цитологии РАН, а также первичные культуры фибробластов, полученные из дермы эмбрионов крыс. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ. Воздействие фитостероидов на клетки изучали в концентрациях от 3,12 мкг/мл до 100 мкг/мл. В результате исследований установлено, что туркестерон из *Ajuga Turkestanica* обладает неизбирательной дозозависимой способностью стимулировать пролиферативную активность всех типов клеток, и особенно клеток рака гортани, стимулируя их пролиферативную активность на 44–63% в изученных концентрациях. В отличие от туркестерона фитостероид экдистерон из *Rhaponticum carthamoides* не стимулирует пролиферацию раковых клеток линий HeLa и HEP-2. Экдистерон в изученном диапазоне концентраций ингибирует рост клеток карциномы шейки матки и гортани на 20–38% и на 8–10% ингибирует рост клеток фибробластов в концентрациях 50–100 мкг/мл. Но при снижении концентрации экдистерона наблюдается рост пролиферативной активности клеток фибробластов на 30–80% и пик пролиферации фибробластов приходится на концентрацию 12,5 мкг/мл. В концентрации 12,5 мкг/мл туркестерон также стимулирует рост клеток фибробластов на 77–80%. Препарат «Аюстан», состоящий из суммы фитостероидов из *Ajuga Turkestanica*, показал смежную между туркестероном и экдистероном картину стимуляции и ингибирования роста клеток, но более приближенную к картине воздействия на клетки туркестерона. Таким образом, фитостероид экдистерон из *Rhaponticum carthamoides* в исследуемых концентрациях проявляет избирательную дозозависимую способность ингибировать рост раковых клеток и с понижением концентрации стимулировать пролиферативную активность нормальных клеток кожи — фибробластов. Фитостероид туркестерон в концентрации 6,25–12,5 мкг/мл также вызывает пролиферацию фибробластов, однако мы считаем данный фитостероид опасным для использования в регенеративной медицине и косметологии и рекомендуем для этих целей только экдистерон как безопасный пролифератор дозозависимого и избирательного действия.

Список литературы

1. Niranjan D., Siddhartha K.M., Anusha B., et al. The phytochemical, biological, and medicinal attributes of phytoecdysteroids: an updated review // *Acta Pharm Sin B*. 2021. Vol. 11, N 7. P. 1740–1766. doi: 10.1016/j.apsb.2020.10.012
2. Dumas M., Bonte F., inventors. *Ajuga Turkestanica* extract and its cosmetic uses. United States patent US 70060693. 2006 Jun 6.

Цибульников С.В. ✉

Разработка микробного компонента для создания релевантных моделей кожи-на-чипе *in vitro*

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

✉ ser-tsibulnikov@yandex.ru

Аннотация. Одну из лидирующих позиций по распространенности как в России, так и мире занимают кожные заболевания. Несмотря на достигаемые успехи в их лечении, значительного снижения уровня заболеваемости не наблюдается. Использование бактериального консорциума на основе *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* позволяет создать репрезентативную модель кожи-на-чипе, которую можно будет использовать для облегчения работ по поиску новых лекарств.

Ключевые слова: орган-на-чипе; микрофлюидные системы; кожа; микробиом.

Tsibulnikov S.V.

Development of a microbial component to create relevant skin-on-a-chip models *in vitro*

Sechenov university, Institute for Regenerative Medicine, Moscow, Russia

Abstract. Skin diseases occupy one of the leading positions in terms of prevalence both in Russia and the world. Despite the successes achieved in their treatment, there is no significant decrease in the incidence rate. Using a bacterial consortium based on *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* allows you to create a representative skin model on a chip that can be used to facilitate the search for new drugs.

Keywords: organ-on-a-chip, microfluidic systems, skin, microbiome.

При разработке модели кожи-на-чипе необходимо учитывать микробный состав, который будет использоваться при культивировании с клеточным компонентом. Для моделирования кожной микробиоты нами были выбраны бактерии следующих видов: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*. Было определено оптимальное соотношение для обеспечения их устойчивого сосуществования и во избежание антагонистических эффектов. Оценка биосовместимости производилась двумя методами: капельным методом и методом штриха. Капельная методика показала, что после 72 часов совместного культивирования не происходит полного замещения культуры *Staphylococcus epidermidis* культурой *Staphylococcus aureus*. Для оценки биосовместимости методом штриха мы нанесли *Staphylococcus epidermidis* штрихом на засеянный «газон» *Staphylococcus aureus*. При этом культура *Staphylococcus aureus* была нанесена в 2 разных количествах — $1 \cdot 10^6$ КОЕ и $5 \cdot 10^5$ КОЕ на чашку. Результаты свидетельствовали о слабом антагонистическом взаимодействии. Для сокультивирования эквивалента кожи с микроорганизмами использовали разработанный и описанный выше вариант консорциума. Была подготовлена смешанная суспензия культур *S. aureus* и *S. epidermidis* в равном соотношении по $5 \cdot 10^5$ КОЕ в 20 мкл. При инокуляции эквивалента кожи в микрофлюидном чипе суспензией бактериального консорциума питательная среда сохраняла розовый цвет в течение трех суток культивирования, что говорит о нормальном pH и отсутствии масштабной контаминации. Полученные результаты лягут в основу многокомпонентной модели кожи человека с микробным консорциумом на основе микрофлюидного чипа. Данная разработка даст возможность предложить новый тип более релевантных моделей кожи за счет наличия микробиома.

Данная работа была поддержана грантом РФФИ № 23-25-00503.

Цимиха А.С. ✉, Кузнецов А.В., Зубарев И.В., Газизова А.Р., Селенина А.В., Пономарцев С.В., Томилин А.Н.

Эффективность клеточного репрограммирования определяется активностью иммунопротеасом

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ atsimokha@incras.ru

Аннотация. Ингибирование активности и нокаут субъединиц иммунопротеасом снижает эффективность образования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши в процессе репрограммирования.

Ключевые слова: убиквитин-протеасомная система (УПС); иммунопротеасома; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК); репрограммирование.

Tsimokha A.S., Kuznetsov A.V., Zubarev I.V., Gazizova A.R., Selenina A.V., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N.

The efficacy of cellular reprogramming is determined by the activity of immunoproteasome

Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Chemical and genetic inactivation of the immunoproteasome in mouse fibroblasts leads to a reduction in the efficiency of induced pluripotent stem cell formation.

Keywords: ubiquitin-proteasome system (UPS); immunoproteasome; induced pluripotent stem cell (iPSC); reprogramming.

Существенный интерес как для регенеративной медицины, так и для фундаментальных исследований в области биологии развития, представляют индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК), которые также как эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) характеризуются способностью к неограниченному самовоспроизведению и дифференцировке во все типы клеток взрослого организма. Несмотря на выраженный интерес к иПСК и на определенные успехи в этой области, эффективность получения и качество иПСК все еще остаются неудовлетворительными, в том числе из-за медленной кинетики процесса и многофакторных требований. Кроме того, все еще остаются недостаточно изученными и молекулярные механизмы индукции клеточной плюрипотентности. Известно, что в поддержании клеточной плюрипотентности и в дифференцировке как ЭСК, так и иПСК, участвует убиквитин-протеасомная система (УПС) — ключевой игрок поддержания протеостаза за счет селективной деградации внутриклеточных белков. Показано, например, что эффективность индукции иПСК из фибробластов мыши снижается при ингибировании активности протеасомы [1]. Адаптация клетки к изменяющимся условиям окружающей среды (например, стресс, вирусная инфекция, воспаление, стимуляция цитокинами и прочее) или внутренним перестройкам (например, становление плюрипотентности и дифференцировка) требует от УПС определенной гибкости, которая связана в том числе с перестройками в популяции протеасомных комплексов. Так, при определенных условиях конститутивные каталитические субъединицы протеасомы могут замещаться индуцибельными — Lmp2, Lmp7 и Mecl-1, формируя иммунопротеасому. Несмотря на то, что иммунопротеасома впервые была описана как компонент иммунной системы, в последнее время появляется все больше данных об участии их в клеточных процессах, не связанных с процессингом антигенов. Так, повышенная экспрессия иммуно-субъединиц протеасом была замечена в ЭСК человека, причем во время дифференцировки происходило заметное снижение синтеза этих субъединиц [2]. Интересно, что авторы также обнаружили, что специфическое ингибирование как конститутивной, так и иммунопротеасомы приводило к полному подавлению

репрограммирования клеток человека в иПСК. В данной работе мы оценили значение активности иммунопротеасом для генерации иПСК при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ) с помощью эктопической экспрессии четырех факторов Яманаки (Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc). Мы показали временную активацию экспрессии иммунопротеасом с 3-го по 7-й дни репрограммирования МЭФ в иПСК. Присутствие в течение всего процесса репрограммирования специфического для протеасомы ингибитора MG132 или специфического для иммунопротеасомы ингибитора PR-957 приводило к значительному снижению образования колоний иПСК, что говорит о роли в процессе репрограммирования не только протеасом, но и иммунопротеасом. Негативное влияние нокаута гена иммунопротеасомы *Psmb8*, кодирующего субъединицу иммунопротеасомы *Lmp7*, на эффективность репрограммирования МЭФ в иПСК подтвердило функциональную роль иммунопротеасом в этом процессе.

Работа выполнена за счет средств гранта Российского научного фонда № 22-14-00390.

Список литературы

1. Floyd Z.E., Staszkiwicz J., Power R.A., et al. Prolonged proteasome inhibition cyclically upregulates oct3/4 and nanog gene expression, but reduces induced pluripotent stem cell colony formation // *Cell Reprogram*. 2015. Vol. 17. P. 95–105. doi: 10.1089/cell.2014.0030
2. Atkinson S.P., Collin J., Irina N., et al. A putative role for the immunoproteasome in the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, N 7. P. 1373–1384. doi: 10.1002/stem.1113

Цховребова Л.В.^{1,2}, Богомазова А.Н.¹ ✉

FISH с олигонуклеотидной пробой, специфичной для AluY-повторов, обеспечивает дифференциальное окрашивание хромосом высокого разрешения у *Macaca mulatta*

¹ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

² Медицинский институт РУДН, Москва, Россия

✉ abogomazova@rcpcm.org

Аннотация. Кариотипирование ИПСК макаки-резус может быть в значительной степени облегчено за счет получения дифференциального окрашивания хромосом при помощи FISH с олигонуклеотидной пробой, специфичной к повторам семейства AluY.

Ключевые слова: дифференциальное окрашивание хромосом; *Macaca mulatta*; FISH; AluY.

Tskhovrebova L.V.^{1,2}, Bogomazova A.N.¹

FISH with an oligonucleotide probe specific to AluY repeats provides differential chromosome banding of high resolution in *Macaca mulatta*

¹ Institute of Medicine, Patrice Lumumba Peoples' Friendship University, Moscow, Russia

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

Abstract. Karyotyping of rhesus macaque iPSCs can be greatly facilitated by obtaining differential chromosome banding using FISH with an oligonucleotide probe specific for AluY repeats.

Keywords: chromosome banding; *Macaca mulatta*; FISH; AluY.

В регенеративной медицине при доклинических испытаниях медицинских технологий, направленных на терапию заболеваний центральной нервной системы, нередко встает необходимость использования приматов и, в частности, макак-резус (*Macaca mulatta*) [1]. Для терапии спинальной травмы в настоящее время разрабатывают и испытывают протоколы клеточной терапии с использованием нейральных стволовых клеток (НСК). Имеющиеся экспериментальные данные свидетельствуют, что трансплантация НСК макакам-резус с нарушениями мозгового кровообращения или травмой центральной нервной системы может значительно ускорить регенеративные процессы в поврежденной нервной ткани при условии создания благоприятного окружения для выживания и дифференцировки трансплантируемых клеток [2].

Одним из источников НСК могут служить индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), которые способны к дифференцировке в различные типы соматических клеток, включая НСК. Для изучения потенциала ИПСК в регенеративной медицине необходимо не только получить эти клетки, но и провести контроль качества ИПСК согласно принятым критериям, включающим среди прочего кариотипирование. Однако если кариотипирование клеток человека является коммерчески доступной услугой, то с задачей кариотипирования ИПСК макаки-резус получившая их лаборатория, как правило, вынуждена справляться самостоятельно. При этом протокол традиционного дифференциального окрашивания хромосом с использованием трипсина и красителя Гимза (GTG) требует длительной отладки и адаптации. Неудивительно, что в этих условиях полученные кариотипы ИПСК отличаются недостаточным качеством и разрешением [3].

В данной работе мы оценили возможности использования для дифференциального окрашивания хромосом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием флуоресцентно-меченых

олигонуклеотидных проб к повторам семейства Alu и Line-1. Для этого мы проанализировали количество и распределение по хромосомам макаки-резус этих повторов и выбрали наиболее распространённые повторы: AluY и L1_RS2, после чего подобрали универсальную пробу к повторам семейства AluY и смесь из 5 проб для выявления повторов семейства L1_RS2. Проведенные эксперименты показали, что FISH с пробами к L1_RS2 повторам дал бэндинг невысокого разрешения, не позволяющий провести надежное кариотипирование. В то же время использование универсальной пробы к повтору AluY обеспечило хромосомный бэндинг хорошего разрешения, паттерн которого близок к GTG-дифференциальному окрашиванию.

Таким образом, кариотипирование клеток макаки-резус может быть в значительной степени облегчено за счет получения дифференциального окрашивания хромосом при помощи FISH с олигонуклеотидной пробой, специфичной к повторам семейства AluY.

Список литературы

1. Rosenzweig E.S., Brock J.H., Lu P., et al. Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord // *Nature medicine*. 2018. Vol. 24, N 4. P. 484–490. doi: 10.1038/nm.4502
2. Wu Y., Mishra A., Qiu Z., et al. Nonhuman primate induced pluripotent stem cells in regenerative medicine // *Stem cells international*. 2012. Vol. 2012. doi: 10.1155/2012/767195
3. Jocher J., Edenhofer F.C., Janssen P., et al. Generation and characterization of three fibroblast-derived Rhesus Macaque induced pluripotent stem cell lines // *Stem Cell Research*. 2024. Vol. 74. doi: 10.1016/j.scr.2023.103277

Чабина А.С.¹ ✉, Середкина П.С.¹, Богданова Д.Н.¹, Кригер Д.В.¹, Нащекин А.В.²,
Курдюков Д.А.², Просалов Н.Д.², Нащекина Ю.А.¹

Модификация матриц на основе полиэфиров диаминами для задач тканевой инженерии

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ chabina-alina@yandex.ru

Аннотация. Работа посвящена модификации полиэфиров введением аминогрупп на поверхность полимеров, а именно химической модификации аргинином или полиэтиленгликольдиамином за счет физического смешивания, а также изучению влияния предложенных модификаций на культивирование мезенхимальных стромальных клеток.

Ключевые слова: полиэфиры; мезенхимальные стромальные клетки; модификация полимера; аминогруппа; композитные материалы; полиэтиленгликоль; поверхностная топология.

Chabina A.S.¹, Seredkina P.S.¹, Bogdanova D.N.¹, Kriger D.V.¹, Nashchekin A.V.², Kurdyukov D.A.²,
Prosalov N.D.², Nashchekina Y.A.¹

Polyester matrices diamine modification for tissue engineering purposes

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Ioffe Institute RAS, Saint Petersburg, Russia

Abstract. The study focuses on the modification of polyesters surfaces by amino groups, specifically through chemical modification with arginine or polyethylene glycol diamine via physical mixing. It also studies the impact of these modifications on the cultivation of mesenchymal stem cells *in vitro*.

Keywords: polyester; mesenchymal stem cells; polymer modification; amino group; composite matrices; polyethylene glycol; surface topology.

Для задач регенеративной медицины матрица в составе тканеинженерной конструкции должна обеспечивать не только адгезию и пролиферацию клеток, но и при этом обладать подходящими механическими характеристиками [2]. Полиэфиры, к которым относятся поли-ε-капролактон (ПКЛ), поли-l-лактид (ПЛЛА) и поли-d,l-лактид (ПДЛА), являются перспективными для создания таких конструкций, так как, помимо простоты работы с этими материалами и варибельности их механических характеристик, указанные полимеры легко модифицировать, придавая им необходимые свойства, например задать особое распределение функциональных групп или придать поверхности определенную топологию. Все это позволяет максимально адаптировать матрицу под конкретный случай регенеративной медицины, а следовательно, и повысить ее эффективность.

Однако будучи синтетическими материалами, полиэфиры обладают рядом существенных недостатков, а именно гидрофобностью, отсутствием сайтов связывания клеток и поверхностного заряда полимера. Для их устранения нами была предложена модификация за счет введения аминогруппы на поверхность полимера. Перспективный вариант такого введения — это взаимодействие с диамином [1, 2], так как такая модификация позволяет не только повысить биосовместимость полиэфиров, но и ввести функциональную группу, к которой в дальнейшем можно прикрепить специфические сайты связывания. Одним из возможных вариантов такой модификации является использование природной аминокислоты аргинина, поскольку в его

составе содержатся две аминогруппы, одна из которых будет обеспечивать связывание с поверхностью матрицы, а вторая создавать положительный поверхностный заряд полиэфира [2]. Другим предложенным вариантом модификации является создание композитной матрицы, в которой источником функциональных групп будет компонент биосовместимого полимера, а именно полиэтиленгликоль диамин (ПЭГ-2NH₂) [1].

Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния различных способов модификации матриц на основе полиэфира диамином на свойства мезенхимальных стромальных клеток (МСК).

В работе были использованы ПКЛ матрицы, полученные методом полива при варьировании таких условий, как объем раствора нанесения, его концентрации и температуры при испарении растворителя, а также композитные матрицы, полученные методом физического смешивания из смеси двух полимеров в следующем массовом соотношении: 70% ПКЛ, ПЛЛА или ПДЛА и 30% ПЭГ-2NH₂. Для модификации матриц на основе ПКЛ их инкубировали в 0,5М водном и 0,25М 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 и придания луночной топологии.

С помощью сканирующей электронной, атомно-силовой и оптической микроскопий было выявлено, что для ПКЛ матриц характерна поверхностная кристаллическая структура, основу которой составляют особые анизотропные образования — сферолиты, форма и размер которых зависят от условий формирования матриц, а также что наибольшее влияние оказывает фактор температуры. На поверхности же композитных матриц после инкубирования в воде происходит формирование пор или лунок, размер которых зависит от вида полиэфира.

Количество сорбировавшегося аргинина и остаток ПЭГ-2NH₂ после инкубирования также изучали с помощью спектрофотометрических методов. Было показано, что наибольшей сорбцией аминокислоты обладают матрицы, полученные при варьировании температуры, а также что в среднем 50% ПЭГ-2NH₂ остается в составе матриц после инкубирования. Дополнительно к диаминам была химически пришита метка FITC, с помощью которой это было подтверждено и было показано равномерное распределение фазы и аминогрупп на поверхности ПКЛ матриц.

Повышение гидрофильности полиэфира после их модификации было также доказано методом сидячей капли. А изменение механических характеристик было изучено с помощью метода одноосного растяжения.

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-спиртовыми растворами аргинина, а для композитных матриц — ПКЛ/ПЭГ-2NH₂ после инкубации. Это подтверждается подсчетом количества клеток после культивирования в течение 2, 4, 24 и 72 часов.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20120).

Список литературы

1. Nashchekina Y., Chabina A., Nashchekin A., et al. Different conditions for the modification of polycaprolactone films with l-arginine // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, N 19. P. 6989. doi: 10.3390/ijms21196989
2. Nashchekina Y., Samusenk, I., Zorin I., et al. Poly(D,L-lactide)/PEG blend films for keratinocyte cultivation and skin reconstruction // *Biomed Mater*. 2019. Vol. 14, N 6. doi: 10.1088/1748-605X/ab3aa2

Чайлахян Р.К.¹, Грошева А.Г.¹, Воробьева Н.Н.², Юсупов В.И.², Свиридов А.П.² ✉

Стимуляция мезенхимных стволовых клеток костного мозга лазерным излучением

¹ ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ sviridoa@gmail.com

Аннотация. Показано увеличение пролиферации мезенхимных стволовых клеток костного мозга крыс *in vitro* и *in vivo* под воздействием лазерного излучения ближнего ИК диапазона умеренной мощности. Результаты важны для ускоренного культивирования аутологичных стволовых клеток с целью обратной трансплантации пациенту.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки; костный мозг; лазерное излучение; фотобиомодуляция.

Chailakhyan R.K.¹, Grosheva A.G.¹, Vorobieva N.N.², Yusupov V.I.², Sviridov A.P.²

Stimulation of bone marrow mesenchymal stem cells with laser radiation

¹ N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

² National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

Abstract. Increased proliferation of rat bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* and *in vivo* under the influence of moderate power near-IR laser radiation was demonstrated. The results are important for accelerated cultivation of autologous stem cells for the purpose of reverse transplantation into the patient.

Keywords: mesenchymal stem cells; bone marrow; laser radiation; photobiomodulation.

В 60-х годах XX века в Национальном Исследовательском Центре эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н. Ф. Гамалеи была открыта уникальная категория стромальных клеток-предшественников, которые в последующих исследованиях были описаны как стволовые клетки стромы костного мозга или мезенхимные стволовые клетки (МСК) [1]. В настоящее время они активно используются в клеточной трансплантологии, в частности для восстановления костной, хрящевой и сухожильной тканей, демонстрируя высокую способность к дифференцировке в хондрогенные и остеогенные типы клеток. К сожалению, среди клеток костного мозга (КМ) МСК составляют лишь $\sim 10^{-4}$, тогда как для терапевтического использования необходимо имплантировать в область повреждения 10^8 – 10^9 клеток. Такое количество МСК КМ достигается культивированием нативного КМ пациента в течение длительного времени. Это увеличивает вероятность полиплоидии клеток и других хромосомных aberrаций. Для исключения подобных изменений, необходимо сократить культивирование до 3–5 пассажей. Среди способов активации пролиферативного и дифференцировочного потенциалов клеток изучаются воздействия на них различных физических факторов, включая лазерные и тепловые.

В предварительных экспериментах *in vitro* данной работы определен терапевтический диапазон кратковременного лазерного воздействия умеренной мощности с длиной волны 0.97 мкм на МСК КМ крысы. Показана возможность существенного увеличения числа клеток в монослойной культуре при умеренном кратковременном нагреве (до 40°C) суспензии клеток лазерным излучением с длиной волны 0.97 мкм. При оптимальной дозе лазерного воздействия наблюдается 6-кратное увеличение количества образовавшихся колоний МСК, что свидетельствует о стимуляции активности клеток [2, 3]. Наблюдаемое увеличение

пролиферации МСК происходит в результате комбинированного действия лазерного излучения и термического нагрева. Рекордный прирост числа колоний и общей численности клеток обусловлен этим синергетическим эффектом. Механизм, посредством которого происходит увеличение пролиферативной и миграционной активности МСК, по аналогии с термином фотобиомодуляция можно назвать термофотобиомодуляцией (ТФБМ).

Экспериментально определены динамика нагрева, а также тепловые и оптические поля внутри костно-мозгового канала при лазерном воздействии с длиной волны 0.97 мкм через стенку кости бедра крысы [4]. Определены оптимальные параметры лазерного воздействия на костный мозг крысы *in vivo* для достижения максимальной пролиферативной активности МСК КМ.

Установлено, что максимальная эффективность колониеобразования в облученной голени достигается на 2-е сутки после лазерного воздействия на костный мозг *in vivo* [5].

Установлено, что дифференцировочные и синтетические потенции МСК КМ крыс не снижаются после лазерного воздействия умеренной интенсивности *in vivo*.

Для выяснения возможной роли отдаленных органов: контрлатеральной (КЛ) голени и плеча — в увеличении численности МСК в облученной голени исследование проводили в разные сроки. Показано, что на облучение голени реагируют не только клетки костного мозга КЛ голени, но и плеча. Максимальный эффект увеличения численности МСК в 3 раза наблюдается в облученной голени на 4-е сутки, реакция клеток костного мозга КЛ голени на облучение выражена не столь сильно. Численность МСК в костном мозге плечевой кости к 4-м суткам резко снижается (~ в 5 раз), часть клеток может осесть, помимо облученной и КЛ голеней, в других органах, например в легких. Прирост МСК в облученной и КЛ голенях возможен по двум причинам: либо за счет стимуляции собственных МСК, либо за счет пополнения из других костномозговых органов.

Оптимизирован метод лазерного воздействия на костный мозг *in vivo* за счет повторного облучения костного мозга голени *in vivo* на 7-е сутки после первого лазерного воздействия. Результаты двойного лазерного воздействия на костный мозг голени крысы *in vivo* выявили возрастание численности МСК в костном мозге облученной голени на 7-й день после повторного облучения, более чем в 5 раз. Значительный рост количества клеток происходит в КЛ голени, что можно объяснить активацией внутренних ресурсов для восстановления клеток.

Активация МСК в травмированном органе возможна при лазерном воздействии на плечо, предплечье, тазовую кость.

Лазерная кратковременная гипертермия костного мозга *in vivo* представляет собой менее инвазивную и простую терапию для клинического восстановления костных дефектов и потенциально может стать многообещающим методом для регенеративной терапии костей и хрящей. Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт» в части лазерного воздействия на клетки и дозиметрии.

Список литературы

1. Чайлахян Р.К., Лалыкина К.С. Спонтанная и индуцированная дифференцировка костной ткани в популяции фибробластоподобных клеток, полученных из длительных монослойных культур костного мозга и селезенки // Доклады АН СССР. 1969. Т. 187, № 2. С. 473–479.
2. Chailakhyan R.K., Grosheva A.G., Vorob'eva N.N., et al. Laser thermo-photobiomodulation of bone marrow mesenchymal stem cells // Bull Exp Biol Med. 2023. Vol. 174. P. 523–526. doi: 10.1007/s10517-023-05741-1
3. Chailakhyan R., Grosheva A., Vorobieva N., et al. Combined light and thermal stimulation of bone marrow stem cells // J Lasers Med Sci. 2024. Vol. 15. doi: 10.34172/jlms.2024.08
4. Yusupov V., Vorobyeva N., Chailakhyan R., et al. Optical and thermal fields induced in the bone marrow by external laser irradiation // Lasers Med Sci. 2022. Vol. 37, N 2. P. 1245–1253. doi: 10.1007/s10103-021-03380-4
5. Chailakhyan R.K., Grosheva A.G., Vorobyeva N.N., et al. Changes in the number of mesenchymal stem cells in bone marrow at different periods after *in vivo* exposure of the bone marrow to local infrared laser radiation // Bull Exp Biol Med. 2022. Vol. 173, N 1. P. 119–122. doi: 10.1007/s10517-022-05505-3

Чарушина Ю.А.¹, Логинова Н.П.¹✉, Заморина С.А.², Раев М.Б.²

Влияние пептидов ТБГ на формирование Т-хелперного ответа 17 типа (Th17) при аллогенной трансплантации клеток костного мозга у крыс Wistar

¹ Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, Россия

✉ natalitsa@yandex.ru

Аннотация. В эксперименте *in vivo* показан иммунофармакологический потенциал пептидов трофобластического бета1-гликопротеина (ТБГ). Пептиды ТБГ подавляли дифференцировку Th17 лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах при локальном действии аллогенного трансплантата (взвесь клеток красного костного мозга).

Ключевые слова: трофобластический β 1-гликопротеин; короткие пептиды; аллогенный трансплантат; Th17; ROR γ t; брыжеечные лимфоузлы.

Charushina Yu.A.¹, Loginova N.P.¹, Zamorina S.A.², Raev M.B.²

Effect of TBG peptides on the formation of T-helper response type 17 (Th17) in allogeneic bone marrow cell transplantation in Wistar rats

¹ Perm State Medical University named after I.I. academician. E.A. Vagner Ministry of Health of the Russian Federation, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences — branch of the Perm Federal Research Center Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. *In vivo* experiments demonstrated the immunopharmacological potential of trophoblastic beta1-glycoprotein (TBG) peptides. TBG peptides suppressed the differentiation of Th17 lymphocytes in mesenteric lymph nodes with local action of an allogeneic transplant (suspension of red bone marrow cells).

Keywords: trophoblastic β 1-glycoprotein; short peptides; allogeneic transplant; Th17; ROR γ t; mesenteric lymph nodes.

Ключевой проблемой в трансплантологии гематопозитических стволовых клеток является развитие иммунного отторжения, что наносит токсическое повреждение организму. Особую роль в разрешении этих патологических эффектов играет точечное подавление иммунного ответа.

Известно, что белки, ассоциированные с беременностью, способны индуцировать иммунную толерантность. Среди них — трофобластический бета1-гликопротеин (ТБГ) [1]. В первичной структуре различных изоформ ТБГ выявлены тетрапептидные участки: YQCE, YECE и YACS, являющиеся консенсусным мотивом YxSx, у которого выявлена иммуномодулирующая активность [2]. Т-хелперный ответ 17 типа (Th17) имеет решающее значение в развитии избыточной воспалительной реакции и деструкции тканей и может являться фактором патогенеза в отторжении трансплантата [3, 4]. Мы предприняли попытку подавить Th17-ответ в условиях трансплантации аллогенных клеток при помощи пептидов ТБГ, ожидая получить супрессорный эффект на развитие этих клеток.

Цель настоящего исследования — оценка влияния пептидов ТБГ на дифференцировку Th17-клеток в брыжеечных лимфатических узлах при экспериментальной аллогенной трансплантации клеток костного мозга. Экспериментальное исследование проводили на крысах самцах линии Wistar. Животных разделили

на три группы: 1-я ($n = 25$) — внутрибрюшинно вводили 10 мл аллогенной суспензии красного костного мозга (ККМ) (10^7 клеток, обработанных камптотецином (50 мкг/мл, «Tocris Bioscience», Великобритания) в 100 мкл физиологического раствора внутрибрюшинно); 2-я ($n = 25$) — внутрибрюшинно вводили 10 мл аллогенной суспензии костного мозга и раствор смеси синтетических пептидов (YECE, YQCE, YVCS, YACS) в рабочей концентрации 12,5 мг; 3-я группа контроль ($n = 25$) — интактные животные. Выведение животных из эксперимента проводилось на 3, 7, 14, 21 и 35-е сутки.

Клетки костного мозга выделяли из бедренных костей, эпифизы которых надрезали ножницами. Полученную суспензию несколько раз пропускали через шприц с иглами уменьшающегося диаметра и фильтровали через один слой капроновой сетки. Производили подсчет клеток и обрабатывали их раствором камптотецина — 50 мкг/мл в среде RPMI-1640 в течение 1 часа при температуре 37°C. После этого клетки пятикратно отмывали в избытке питательной среды (последняя отмывка — физиологическим раствором) и доводили до концентрации 10^8 /мл или 10^7 /100 мкл в физиологическом растворе. В исследованиях использовали модель локальной аллотрансплантации. Трансплантацию 10^7 клеток в объеме среды 100 мкл производили с помощью шприца внутрибрюшинно.

Исследовали брыжеечные лимфатические узлы. Методом иммуногистохимии оценивали экспрессию ROR γ t (recombinant; Ile31-Arg248), который является мастер-регулятором Th17. Установлено, что аллогенная трансплантация ККМ стимулировала дифференцировку Th17 в брыжеечных лимфатических узлах на протяжении всего эксперимента. Начиная с 7-х сут и до конца эксперимента Th17 лимфоциты присутствовали диффузно, формируя скопления в зонах органа. Позитивно окрашенные лимфоциты в большом количестве имелись в субкапсулярном синусе. В свою очередь, сочетанное введение пептидов ТБГ и ККМ к 14-м сут имело тенденцию количественного роста, но на 21-е сут наблюдали снижение экспрессии ROR γ t в зонах пролиферации и дифференцировки лимфоцитов коркового вещества брыжеечных лимфатических узлов. Положительная экспрессия транскрипционного фактора ROR γ t имела в единичных клетках паракортикальной зоны коры и в мозговых тяжах органа. Динамика снижения маркера была медленной и достоверно проявилась только к концу эксперимента (35-е сут), демонстрируя накопительный эффект в отношении дифференцировки Th17. Таким образом, пептиды ТБГ подавляли дифференцировку Th17 лимфоцитов в брыжеечных лимфатических узлах при локальном действии аллогенного трансплантата. Снижение уровня Th17, в свою очередь, исключает выраженность иммунного ответа на аллогенные ККМ. Таким образом, мы установили новый аспект иммуносупрессирующей активности пептидов ТБГ, ассоциированный с формированием Т-хелперов 17 типа. Важно отметить, что влияние ТБГ на динамику накопления ROR γ t в лимфоидных органах продемонстрировали впервые. Полученные данные свидетельствуют об иммунофармакологическом потенциале изучаемых пептидов.

Список литературы

1. Jones K., Bryant S., Luo J., et al. Recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1 has a protective role in a murine model of acute graft-versus-host disease // *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019. Vol. 25, N 2. P. 193–203. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.09.022
2. Moldogazieva N.T., Terentiev A.A., Antonov M.Y., et al. Correlation between biological activity and conformational dynamics properties of tetra- and pentapeptides derived from fetoplacental proteins // *Biochemistry (Mosc)*. 2012. Vol. 77, N 5. P. 469–484. doi: 10.1134/S0006297912050070
3. McGeachy M.J., Cua D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road // *Immunity*. 2008. Vol. 4, N 4. P. 445–453. doi: 10.1016/j.immuni.2008.03.001
4. Zhou Y., Yang X., Zhang H., et al. The role of T helper type 17/regulatory T cells in acute rejection after liver transplantation in rats // *Transplantation*. 2015. Vol. 99, N 6. P. 1126–1131. doi: 10.1097/TP.0000000000000666

Червякова Я.В. ✉, Масленникова А.К.Ю.

Исследование влияния локализации защитного С-пептида 2P23 на N-конце экзогенного CXCR4 на хемотаксис клеток и защитные свойства пептида

Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

✉ chervyakovayaroslava@gmail.com

Аннотация. Мы продемонстрировали, что экзогенный CXCR4 повышает эффективность хемотаксиса клеточных линий, а слитый с N-концом экзогенного CXCR4 С-пептид 2P23 не снижает эффективность миграции клеток и эффективно защищает их от проникновения ВИЧ, независимо от его тропизма.

Ключевые слова: генотерапия ВИЧ; С-пептиды; CD34+ гемопоэтические стволовые клетки; CXCR4.

Chervyakova Y.V., Maslennikova A.K.Y.

Investigation of the effect of localization of protective C-peptide 2P23 at the N-terminus of exogenous CXCR4 on cell chemotaxis and protective properties of the peptide

Institute of Gene Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Abstract. We have demonstrated that exogenous CXCR4 increases the efficiency of chemotaxis of cell lines, and fused with the N-terminus of exogenous CXCR4 C-peptide 2P23 does not reduce the efficiency of cell migration and effectively protects them from HIV entry regardless of its tropism.

Keywords: HIV gene therapy; C-peptides; CD34+ hematopoietic stem cells; CXCR4.

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) поражает CD4+ Т-лимфоциты человека, в результате чего развивается синдром приобретённого иммунодефицита человека (СПИД) — терминальная стадия заболевания. СПИД характеризуется развитием инфекционных заболеваний и опухолей и приводит к летальному исходу. На данный момент не существует терапии ВИЧ-инфекции, которая позволяет добиться полной эрадикации вируса из организма.

Целью нашего исследования является формирование в организме пациента резервуара CD4+ Т-лимфоцитов, устойчивых к инфицированию ВИЧ. Для этого в геном клеток методом лентивирусной трансдукции вносятся генетические последовательности для экспонирования на цитоплазматической мембране защитных С-пептидов, блокирующих проникновение вируса. С-пептиды представляют собой последовательности из белка слияния ВИЧ. Экспонируясь на поверхности клетки, они блокируют образование структуры, необходимой для проникновения ВИЧ. Ранее в нашей лаборатории было показано, что наиболее высокой анти-ВИЧ активностью обладают генетически кодируемые С-пептиды MT-C34, 2P23 и HP23L в контексте GPI-заякоренного белка человека CD52 [1].

Перспективной мишенью для генотерапии ВИЧ-инфекции являются CD34+ стволовые клетки, так как они являются предшественниками клеток крови, в том числе CD4+ Т-лимфоцитов. Для эффективной терапии необходимо, чтобы модифицированные клетки возвращались в костный мозг, так как это необходимо для их приживления. Сообщается, что экспрессия экзогенного CXCR4 в стволовых CD34+ клетках повышает уровень их миграции в костный мозг [2]. Однако, в контексте разработки генотерапии ВИЧ-инфекции, сверхэкспрессия CXCR4 может увеличить подверженность клеток инфицированию X4-тропными штаммами ВИЧ. Нами было выдвинуто предположение, что экспрессия экзогенного CXCR4, модифицированного на N-конце

защитным С-пептидом 2P23, будет способствовать как повышению эффективности миграции клеток, так и их устойчивости к инфицированию ВИЧ.

Для проверки гипотезы нами были созданы генетические конструкции для внесения путем лентивирусной трансдукции экзогенного *CXCR4* дикого типа и модифицированного пептидом 2P23. На их основе были получены модельные лимфобластные клеточные линии СЕМ, несущие целевую конструкцию. Клеточные линии были охарактеризованы по их способности к хемотаксису под действием лиганда SDF-1 и по уровню защищённости от инфицирования ВИЧ с разным тропизмом.

Было выявлено, что экзогенный *CXCR4* повышает эффективность хемотаксиса полученных клеточных линий, а слитый с N-концом экзогенного *CXCR4* С-пептид 2P23 не снижает эффективность миграции клеток. Клеточная линия, несущая *CXCR4*, с N-концом которого слит пептид 2P23, показала высокий уровень защищённости от инфицирования ВИЧ, независимо от тропности вируса.

Исследование выполнено при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации № 075-15-2019-1661.

Список литературы

1. Maslennikova A., Kruglova N., Kalinichenko S., et al. Engineering T-cell resistance to HIV-1 infection via knock-in of peptides from the heptad repeat 2 domain of gp41 // *mBio*. 2022. Vol. 13, N 1. doi: 10.1128/mbio.03589-21
2. Wang H., Germond A., Li C., et al. *In vivo* HSC transduction in rhesus macaques with an HDAd5/3+ vector targeting desmoglein 2 and transiently overexpressing *cxc4* // *Blood Adv*. 2022. Vol. 6, N 15. P. 4360–4372. doi: 10.1182/bloodadvances.2022007975

Черемных А.И. ✉, Никитин А.А., Ковалева П.А., Львов В.А., Сенатов Ф.С.

Влияние магнитных наночастиц феррита кобальта на физико-механические свойства, биосовместимость и эффект памяти формы полилактида

Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва, Россия

✉ a.zimina@misis.ru

Аннотация. Данная работа посвящена разработке и исследованию структуры и свойств композиционных материалов с эффектом памяти формы на основе полилактида и наночастиц феррита кобальта, а также оценке влияния наполнителя на эффект памяти формы и биосовместимость полилактида.

Ключевые слова: полилактид; феррит кобальта; эффект памяти формы; магниточувствительные композиты.

Cheremnykh A.I., Nikitin A.A., Kovaleva P.A., Lvov V.A., Senatov F.S.

Impact of cobalt ferrite magnetic nanoparticles on the physical and mechanical properties, biocompatibility and shape memory effect of polylactide

National University of Science and Technology "MISIS", Moscow, Russia

Abstract. This work is related to the development and research of the structure and properties of composite materials with shape memory effect based on polylactide and cobalt ferrite nanoparticles. The effect of the filler on the shape memory effect and biocompatibility of polylactide was also evaluated.

Keywords: polylactide; cobalt ferrite; shape memory effect; magneto-responsive composites.

В настоящее время растет интерес к полимерам с эффектом памяти формы (ЭПФ) для создания адаптивных медицинских устройств. Привлекательность полимеров с ЭПФ для таких применений заключается в их способности восстанавливать форму, высоких значениях восстанавливаемых деформаций (до 1000%), программируемости свойств и возможности дистанционной активации (ЭПФ). Одним из наиболее изученных полимеров с ЭПФ является полилактид (ПЛА). Он относится к термоактивируемым полимерам T_g -типа, когда активация ЭПФ происходит при температуре стеклования. Для удаленной активации ЭПФ в полимерных композиционных материалах (ПКМ) в качестве наполнителя могут быть использованы магнитные частицы, что обеспечит нагрев ПКМ под действием высокочастотного переменного магнитного поля. Механизм фиксации и восстановления формы связан с надмолекулярной структурой полимера. Мягкие сегменты становятся подвижными при нагревании выше T_g и легко деформируются. Жесткие сегменты остаются в стеклообразном состоянии и отвечают за восстановление своей формы [1]. Частицы наполнителя могут выступать в качестве жесткой фазы сами по себе или как центры кристаллизации полимера. Соотношение мягкой и твердой фаз, а также тип надмолекулярной структуры могут существенно варьироваться [2].

В данной работе исследовали композиционный материал на основе ПЛА и наночастиц феррита кобальта (НЧ ФК). КМ на основе ПЛА с различным содержанием НЧ ФК (1, 5, 10% масс.) были получены методом экструзии. Степень кристалличности образцов чистого ПЛА и ПЛА/ФК (1 и 5% масс.) не превышала 8,1%. Однако для композиционного материала с 10% масс. НЧ ФК значение степени кристалличности составило 27,0%. Отмечено, что степень кристалличности полимерной матрицы возрастает с увеличением количества наполнителя в композиционном материале, а НЧ ФК выступают в качестве центров кристаллизации и образования дополнительной жесткой неподвижной фазы, определяющей свойства памяти формы. Температура,

при которой начинается восстанавливаемая деформация, снижалась по мере увеличения массовой доли НЧ ФК в матрице ПЛА наряду с уменьшением температуры стеклования. Значение возвращающих напряжений в процессе динамического механического анализа увеличивалось с ростом массовой доли НЧ и достигало 3,6 МПа при максимальной концентрации наполнителя.

Была также изучена надмолекулярная структура композиционных материалов, полученных методом экструзии и литья из растворителя с последующим отжигом на основе ПЛА с 1% масс. НЧ ФК. Исследована способность этих материалов фиксировать и восстанавливать форму в зависимости от сформированной структуры. В ходе исследования было продемонстрировано влияние степени кристалличности и типа кристаллической структуры на реализацию ЭПФ. Кроме того, была визуализирована надмолекулярная структура ПКМ на разных этапах реализации ЭПФ. Во время фиксации временной формы наблюдаются крейзы и кавитация, которые при восстановлении первоначальной формы схлопываются, образуя ориентированную структуру. Эти процессы также влияют на способность материала восстанавливать форму. Материал, полученный методом литья без отжига, лучше всего фиксировал временную и восстанавливал исходную форму за счет большого количества сферолитных структур.

Результаты исследований *in vitro* показали, что образцы ПЛА и ПЛА/ФК (1, 5 и 10% масс.) не оказывали значительного цитотоксического эффекта и не влияли на пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток мыши. Такой материал может быть перспективен для создания адаптивных медицинских устройств, таких как фиксаторы мягких тканей и «самопозиционирующихся» костных имплантатов. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (№ 21-73-20205).

Список литературы

1. Behl M., Lendlein A. Shape-memory polymers // *Materials Today*. 2007. Vol. 10, N 4. P. 20–28. doi: 10.1016/S1369-7021(07)70047-0
2. Зими́на А.И., Ковалева П.А., Киселев Д.А., и др. Влияние надмолекулярной и кристаллической структуры полилактида на реализацию эффекта памяти формы // *Известия РАН. Серия физическая*. 2023. Т. 87, № 6. С. 773–779. EDN: VKHFFJ doi: 10.31857/S036767652370134X

Черкашина О.Л.¹ ✉, Цитрина А.А.², Аболин Д.С.¹, Косых А.В.³, Воротеяк Е.А.¹, Калабушева Е.П.¹

Паттерн пролиферации в регенерирующей коже человека на модели ксенотрансплантации

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

² Ilse Katz Institute of Nanoscale Science, Беэр-Шева, Израиль

³ Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

✉ olgalcher@gmail.com

Аннотация. Был описан паттерн пролиферации кератиноцитов в эпидермисе ксенотрансплантированной кожи человека. Скорость делений зависела от расположения клеток относительно эпидермальных гребней. Распределение пролиферирующих клеток может влиять на нормальный и патологический морфогенез эпидермиса.

Ключевые слова: пролиферация кератиноцитов; включение пролиферативной метки; регенерация эпидермиса; ксенотрансплантация.

Cherkashina O.L.¹, Tsitrina A.A.², Abolin D.S.¹, Kosykh A.V.³, Vorotelyak E.A.¹, Kalabusheva E.P.¹

Proliferation pattern in regenerating human skin in a xenotransplantation model

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Ilse Katz Institute of Nanoscale Science, Beer Sheva, Israel

³ Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The pattern of keratinocyte proliferation in the epidermis of xenografted human skin was described. The rate of cell divisions depended on the location relative to the epidermal ridges. The distribution of proliferating cells may influence the normal and pathological morphogenesis of epidermis.

Keywords: keratinocyte proliferation; proliferative label incorporation; epidermal regeneration; xenotransplantation.

Структура дифференцировочной иерархии кератиноцитов в эпидермисе человека изучается с середины прошлого века, но до сих пор содержит множество обсуждаемых проблем. Классической моделью считается эпидермальная пролиферативная единица, в основании которой располагается редко пролиферирующая стволовая клетка, дающая начало активно делящимся прогениторам [1]. Согласно другим моделям в эпидермисе присутствует один тип прогениторных клеток, делящихся с одинаковой средней скоростью [2]. Часть моделей указывают на наличие двух популяций кератиноцитов с разной скоростью делений, локализация которых имеет зависимость от эпидермальных гребней, маркерами которых могут служить KRT15 и Col17a1 [3]. Некоторые данные указывают на то, что наиболее активно пролиферирующие клетки локализованы ближе к волосяным фолликулам [4]. Основные экспериментальные данные получены на лабораторных животных, клетки человека чаще изучают в культуральных условиях ввиду ограниченности доступных методов, позволяющих отслеживать клеточную судьбу.

Для исследования процесса регенерации мы разработали модель ксенотрансплантации полнослойного лоскута кожи человека мышам с иммунодефицитом. Биопсии брали на 40, 75 и 110-е сутки после ксенотрансплантации. За неделю до взятия биопсии мышам вводили метку BrdU, которая встраивается в пролиферирующие клетки и выявляется иммуногистохимически. Анализ распределения BrdU, Ki67, Col17a1, KRT15 в эпидермисе был проведен на основе иммуногистохимического окрашивания. Для характеристики

паттерна пролиферирующих клеток был разработан протокол обработки гистологических изображений в программном обеспечении QuPath.

На ранних этапах регенерации эпидермис гипертрофирован, нарушена экспрессия маркеров дифференцированного состояния кератиноцитов, эпидермальные гребни начинают формироваться, однако экспрессия Col17a1 и KRT15 не привязана к инвагинациям эпидермиса. Активность пролиферации клеток не зависит от их локализации относительно инвагинаций эпидермиса, а также от расстояния до волосяных фолликулов. К 110-м суткам процессы в ксенотрансплантате достигают гомеостаза, поэтому мы рассматриваем этот срок как наиболее близкий к норме. На этом сроке кератиноциты, расположенные в эпидермальных гребнях, экспрессируют KRT15 и содержат меньше Col17a1 по сравнению с областью между гребнями. На основе интенсивности флуоресценции BrdU и Ki67, а также морфологических параметров — площади и округлости ядра, провели кластерный анализ ядер кератиноцитов, выявили 4 основных кластера. Кластер клеток, локализованный преимущественно в эпидермальных гребнях, имел более низкую интенсивность флуоресценции BrdU, что свидетельствует о размытии метки и более активной пролиферации. Между гребнями располагался кластер клеток с более интенсивной флуоресценцией BrdU. Наряду с клетками, сохраняющими метку, между гребнями было выявлено два кластера активно делящихся клеток, которые различаются между собой степенью округлости ядра. В то же время ни на одном из сроков не было обнаружено связи между содержанием метки BrdU и расстоянием клеток межфолликулярного эпидермиса до волосяных фолликулов. Вероятно, в коже человека интенсивность пролиферации кератиноцитов не привязана к волосяным фолликулам в отличие от эпидермиса мыши.

Согласно полученным данным, скорость пролиферации кератиноцитов связана с эпидермальными гребнями, однако в межгребневой области встречаются как покоящиеся, так и активно делящиеся клетки, что не до конца соотносится с моделью наличия двух популяций клеток, пролиферирующих с разной скоростью в зависимости от локализации. Не было также обнаружено связи между интенсивностью пролиферации и расстоянием до волосяных фолликулов. Исследование паттерна распределения пролиферирующих клеток в эпидермисе человека позволит изучить подробнее механизмы регенерации кожи в ходе реэпителизации при ранозаживлении, а также процессы, сопутствующие развитию кожных патологий.

Работа поддержана грантом РФ № 21-74-30015.

Список литературы

1. Potten C.S. The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell // *Cell Tissue Kinet.* 1974. Vol. 7. P. 77–88. doi: 10.1111/j.1365-2184.1974.tb00401.x
2. Piedrafita G., Kostiou V., Wabik A., et al. A single-progenitor model as the unifying paradigm of epidermal and esophageal epithelial maintenance in mice // *Nat Commun.* 2020. Vol. 11, N. 1. P. 1429. doi: 10.1038/s41467-020-15258-0
3. Ghuwalewala S., Lee S.A., Jiang K., et al. Epidermal basal domains organization highlights skin robustness to environmental exposure 2022. doi: 10.1101/2022.02.23.481662
4. Roy E., Neufeld Z., Cerone L., et al. Bi-modal behaviour of interfollicular epidermal progenitors regulated by hair follicle position and cycling // *EMBO J.* 2016. Vol. 35. P. 2658–2670. doi: 10.15252/embj.201693806

Чечехина Е.С. ✉, Волошин Н.С., Кулебякин К.Ю., Чечехин В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.

Создание и применение инструмента для прижизненной оценки старения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на основе фазово-контрастных изображений

МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ voynovaes.pharm@gmail.com

Аннотация. Разработана нейросетевая модель для прижизненной оценки старения мультипотентных мезенхимных стромальных клеток на основе фазово-контрастных изображений. Использование методов машинного обучения позволило достичь точности классификации свыше 80%, открывая новые перспективы в клеточной биологии и медицине.

Ключевые слова: мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; старение; искусственный интеллект; компьютерное зрение.

Chechekhina E.S., Voloshin N.S., Kulebyakin K.Yu., Chechekhin V.I., Tyurin-Kuzmin P.A.

Development and application of a tool for live assessment of senescence in multipotent mesenchymal stromal cells based on phase-contrast images

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. A neural network model has been developed for the live assessment of senescence in multipotent mesenchymal stromal cells based on phase-contrast images. The application of machine learning methods achieved a classification accuracy of over 80%, offering new prospects in cell biology and medicine.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells; aging; artificial intelligence; computer vision.

Прижизненная оценка старения (сенесцентности) клеток представляет собой важную задачу в клеточной биологии и медицине, особенно в контексте длительного культивирования клеток или их использования в медицинских приложениях. На данный момент большинство методов анализа сенесцентности клеток подразумевают их гибель или значительное воздействие на клетку. Например, окрашивание на бета-галактозидазу, которое используется как золотой стандарт для определения сенесцентного фенотипа, требует фиксации клеток, что делает невозможным их дальнейшее использование. Такие подходы не позволяют исследователям отслеживать дальнейшую судьбу отдельных клеток или оценивать гетерогенность популяции, что особенно важно для работы с мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (МСК). Популяция МСК характеризуется высокой неоднородностью, а наличие в ней сенесцентных клеток значительно влияет на ее свойства, включая способность к дифференцировке и чувствительность к внешним стимулам. Для решения этих проблем необходимы методы, позволяющие прижизненно оценивать состояние клеток без деструктивного воздействия.

Использование алгоритмов компьютерного зрения является перспективным направлением для автоматизации процесса оценки состояния клеток. Эти технологии позволяют значительно сократить затраты времени на проведение рутинных анализов, улучшить точность и объективность оценок, а также снизить потребление дорогостоящих реактивов. Примеры успешного использования таких методов уже встречаются в литературе, где глубокие нейронные сети применяются для идентификации дифференцировки и предсказания старения клеток [1–3].

В нашей работе мы разработали инструмент на основе методов машинного обучения для классификации МСК на молодые и сенесцентные клетки с использованием фазово-контрастных микроскопных изображений. Для обучения модели использовался датасет, включающий изображения МСК, прошедшие окрашивание на бета-галактозидазу, а также флуоресцентные снимки с окраской DAPI для облегчения детектирования и подсчета клеток. Разметка данных проводилась с помощью инструмента Cellpose 2.0, который был адаптирован для работы с фазово-контрастными изображениями.

Одной из основных проблем, с которой мы столкнулись, был дисбаланс классов в датасете, так как количество молодых клеток значительно превышало количество старых. Для решения этой проблемы была применена методика случайного удаления молодых клеток для выравнивания количества классов в тренировочном и тестовом наборах данных. Для классификации клеток мы использовали модели CustomResnet, EfficientNet и Vision Transformers, среди которых наилучший результат показала EfficientNet B6, с точностью, превышающей 80%.

Таким образом, разработанная нами модель позволяет не только проводить прижизненную оценку сенесцентности МСК, но и отслеживать динамику этого процесса на уровне отдельных клеток. Это открывает новые возможности для контроля качества культур клеток, используемых в производстве лекарственных препаратов, а также изучения популяций на уровне одиночных клеток. Модель также может быть дообучена и использована для решения аналогичных задач в других направлениях клеточной биологии и медицины.

Работа была поддержана грантом РФФ 19-75-30007-П.

Список литературы

1. Lan Y., Huang N., Fu Y., et al. Morphology-based deep learning approach for predicting osteogenic differentiation // *Front Bioeng Biotechnol.* 2022. Vol. 9. doi: 10.3389/fbioe.2021.802794
2. Zhai W., Yong D., El-Jawhari J.J., et al. Identification of senescent cells in multipotent mesenchymal stromal cell cultures: current methods and future directions // *Cytotherapy.* 2019. Vol. 21, N 8. P. 803–819. doi: 10.1016/j.jcyt.2019.05.001
3. Heckenbach I., Mkrtychan G.V., Ezra M.B., et al. Nuclear morphology is a deep learning biomarker of cellular senescence // *Nat Aging.* 2022. Vol. 2, N 8. P. 742–755. doi: 10.1038/s43587-022-00263-3

Чечехина Е.С. ✉, Каменков С.С., Кулебякин К.Ю., Антропова Ю.Г., Зиновьева А.А.,
Бахчинян Е., Ефименко А.Ю., Тюрин-Кузьмин П.А.

Роль межклеточной сигнализации в нарушении адипогенной дифференцировки МСК при старении

МНОИ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ voynovaes.pharm@gmail.com

Аннотация. Сенесцентные мезенхимные мультипотентные стромальные клетки приобретают инсулино-резистентность, а также паракринным способом способны изменять фенотип молодых клеток. Повышение уровня белка PTEN в сенесцентных клетках служит защитным механизмом, предотвращающим деление и дифференцировку.

Ключевые слова: мезенхимные мультипотентные стромальные клетки; старение; секреторный фенотип, ассоциированный со старением; PTEN; ядро; цитоплазма.

Chechekhina E.S., Kamenkov S.S., Kulebyakin K.Yu., Antropova Yu.G., Zinoveva A.A.,
Bakhchinyan E., Efimenko A.Yu., Tyurin-Kuzmin P.A.

The role of intercellular signaling in impaired adipogenic differentiation of MSCs during aging

Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Senescent mesenchymal multipotent stromal cells develop insulin resistance and are also capable of altering the phenotype of young cells through paracrine signaling. The increased level of PTEN protein in senescent cells serves as a protective mechanism, preventing cell division and differentiation.

Keywords: mesenchymal multipotent stromal cells; aging; senescence-associated secretory phenotype; PTEN; nucleus; cytoplasm.

Обновление тканей — ключевой процесс, обеспечивающий поддержание гомеостаза и нормального функционального состояния органов на протяжении жизни. В его основе лежат такие процессы, как пролиферация и дифференцировка клеток, а также замещение поврежденных и дисфункциональных клеток новыми. Центральную роль в обновлении тканей играют мезенхимные мультипотентные стромальные клетки (МСК), которые необходимы не только для формирования стромы и регуляции большинства тканей, но и для образования таких тканей, как жировая, костная и хрящевая. Благодаря своей секреторной активности, способности к самообновлению и дифференцировке, МСК активно участвуют в поддержании и восстановлении тканей. Однако с возрастом функции МСК значительно ухудшаются, что приводит к нарушению обновления тканей и развитию различных патологий.

В качестве модели для изучения механизмов обновления нами была выбрана жировая ткань. Нарушения обновления жировой ткани, происходящие с возрастом, могут вести к развитию различных заболеваний, например сахарного диабета и ожирения [1]. Считается, что старение и ожирение приводят к увеличению количества сенесцентных клеток в различных тканях, включая популяцию МСК [2]. Эти клетки, в свою очередь, секретируют факторы, которые могут негативно влиять на окружающие клетки, вызывая паракринные изменения и дальнейшее ухудшение функции ткани. При этом развивается инсулинорезистентность — нарушение чувствительности клеток к инсулину, являющемуся основным регулятором адипогенеза.

Проведенные нами исследования показали, что МСК, выделенные от пожилых доноров, обладают множеством признаков сенесцентных клеток, в том числе сниженным пролиферативным потенциалом и более

высокими уровнями экспрессии маркеров старения, таких как β -галактозидаза и p21. Данные клетки показали сниженный адипогенный потенциал, связанный с развитием инсулинорезистентности. Наблюдаемое нарушение проявлялось в увеличении базального уровня фосфорилирования Akt и ERK1/2 — ключевых участников канонических PI3K и MAPK инсулиновых сигнальных каскадов. При этом инсулин-зависимого повышения фосфорилирования данных киназ по сравнению с клетками молодых доноров не происходило.

Также нами было показано, что внеклеточные везикулы (ВВ), секретируемые сенесцентными МСК, содержат микроРНК, способные негативно влиять на инсулиновый сигнал и адипогенную дифференцировку. Эти ВВ, попадая в молодые клетки, способствуют развитию в них сенесцентного фенотипа, снижению чувствительности к инсулину за счет повышения базального уровня фосфорилирования киназ и снижению эффективности адипогенной дифференцировки.

Одной из наиболее важных мишеней микроРНК, повышенных в составе ВВ сенесцентных МСК, является PTEN — белок-ингибитор PI3K сигнального каскада. Используя вестерн-блоттинг, мы показали, что уровень данного белка в сенесцентных клетках оказался в несколько раз выше, чем в молодых. Оценив уровень PTEN в ядерной и цитоплазматической фракциях, мы выяснили, что данные изменения происходят исключительно за счет увеличения количества PTEN в ядре. Известно, что накопление данного белка в ядре способствует остановке клеточного цикла, а также запускает системы репарации ДНК. Для сенесцентных клеток данные изменения могут носить протективный характер, поскольку накопившие повреждения клетки таким образом ограничиваются в своей пролиферации и стремятся восстановить нормальное функционирование. Для того, чтобы поддерживать стабильно высокий уровень PTEN, сенесцентным клеткам необходимо также защитить себя от воздействия собственных везикул, поскольку содержащиеся в них микроРНК нацелены на снижение уровня данного белка. Одним из таких механизмов защиты служит повышение уровня экспрессии мРНК псевдогена PTEN — PTENP1. Данная мРНК обладает аналогичным сродством ко всем микроРНК к мРНК PTEN, что позволяет ей экранировать микроРНК, сохраняя при этом стабильно высокий уровень PTEN. Используя ПЦР в реальном времени, мы показали, что уровень PTENP1 в сенесцентных клетках возрастает в десять и более раз. А значит микроРНК с большей вероятностью связываются с PTENP1, а не с PTEN.

Таким образом, старение приводит к снижению пролиферативного и дифференцировочного потенциала МСК. Также МСК пожилых доноров секретируют внеклеточные везикулы, способные формировать в окружающих клетках инсулинорезистентность и снижение адипогенного потенциала. Увеличение уровня PTEN и PTENP1 в сенесцентных МСК может служить одним из механизмов, ограничивающих деление и дифференцировку данных клеток.

Работа выполнена при поддержке фонда РФ (Грант № 19-75-30007, Фундаментальные проблемы регенеративной медицины: регуляция обновления и репарации тканей человека. <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>).

Список литературы

1. Kim S.M., Lun M., Wang M., et al. Loss of white adipose hyperplastic potential is associated with enhanced susceptibility to insulin resistance // *Cell Metab.* 2014. Vol. 20, N 6. P. 1049–1058. doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.010
2. Childs B.G., Durik M., Baker D.J., et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy // *Nat Med.* 2015. Vol. 21, N 12. P. 1424–1435. doi: 10.1038/nm.4000

Чибирова Т.Т.¹ ✉, Кокаев Р.И.¹, Ислаев А.А.¹, Кокаев Г.С.¹, Скупневский С.В.^{1,2}

Влияния серотонина адипината на пролиферацию и способность к миграции *in vitro* мезенхимальных стволовых клеток и фибробластов кожи и подкожно-жировой клетчатки

¹ Институт биомедицинских исследований — филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, Россия

² ФГОУ ВО «Северо-Осетинский государственный университет им. К.Л. Хетагурова», Владикавказ, Россия

✉ tamaramerdenova@mail.ru

Аннотация. Введение в среду культивации первичных культур МСК и фибробластов кожи и подкожно-жировой клетчатки серотонина адипината привело к повышению пролиферативной активности и выживаемости клеток, как и к повышению условной скорости миграции и общего количества мигрировавших клеток.

Ключевые слова: серотонин адипинат; фибробласты; мезенхимальные стволовые клетки; регенерация.

Chibirova T.T.¹, Kokaev R.I.¹, Islaev A.A.¹, Kokaev G.S.¹, Skupnevskii S.V.^{1,2}

The effect of serotonin adipinate on the proliferation and *in vitro* migration ability of skin and subcutaneous adipose tissue progenitor cells

¹ Institute of Biomedical Investigations — the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of Russian Academy of Sciences, Vladikavkaz, Russia

² North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia

Abstract. Introduction of serotonin adipate into the culture medium of primary cultures of MSCs and skin fibroblasts and subcutaneous fat tissue resulted in an increase in proliferative activity and cell survival, as well as an increase in the conditional migration rate and the total number of migrated cells.

Keywords: serotonin adipate; fibroblasts; mesenchymal stem cells; regeneration.

Вопрос о поиске эффективных и безопасных средств лечения ран всегда остро стоял перед медицинской наукой. При повреждении собственный репаративный потенциал не всегда обеспечивает полную регенерацию и восстановление анатомии и физиологии ткани. Зачастую организм выбирает путь регенерации, при котором происходит быстрое склерозирование сосудов и закрытие раны, чтобы спасти жизнь организма в целом, но при этом не происходит полной репарации тканей, которая может замещаться соединительной тканью и приводить к инвалидизации людей. В связи с необходимостью быстрого восстановления и сокращения сроков реабилитации человека, снижения рисков инвалидизации, необходимы дополнительные стимулирующие механизмы, которые ускорят процесс регенерации, сделают ее более полноценной и уменьшат воспалительный компонент. Поскольку первичная сосудистая реакция на травму начинается с интенсивной вазоконстрикции, которая далее сменяется фазой вазодилатации, способствующей повышению сосудистой проницаемости, то одной из ключевых ролей в последнем механизме играет гистамин и его аналог по механизму действия — серотонин. В этой связи нами начато исследование по изучению влияния серотонина на процессы ранозаживления.

5-Гидрокситриптамин (5-НТ, серотонин) — один из наиболее изученных нейротрансмиттеров центральной нервной системы (ЦНС), который выполняет множество физиологических функций вне ЦНС. К ним относятся стимуляция выработки цитокинов и хемокинов, вазоконстрикция, регенерация тканей, клеток

(фибробластов, гладкомышечных клеток, эндотелиальных клеток), пролиферация и миграция (эозинофилов, тучных клеток, дендритных клеток) и регуляция иммунной системы [1, 2]. В связи с выше обозначенным, целью работы было определение регенераторного потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и прогениторных клеток кожи и подкожно-жировой клетчатки — фибробластов, под влиянием серотонина в эксперименте *in vitro*. Исследование проводилось на первичных культурах клеток (в том числе фибробласты и МСК) кожи и подкожно-жировой клетчатки, получаемых от крыс линии Вистар. Оценка пролиферации и выживаемости клеток производилась на 2, 3, 4, 5-е сутки инкубации клеток путем визуального подсчета клеток в тридцати полях зрения с помощью инвертированного микроскопа (Zeiss AxioVert.A1 F1), а в конце исследования при помощи автоматического счетчика клеток (BioRad TC20) с применением красителя — трипанового синего. Влияние серотонина привело к повышению пролиферативной активности фибробластов и МСК кожи, отмечаемое уже с 3-х суток исследования ($p < 0,001$). Клетки ПЖК также отреагировали на введение в стандартную среду серотонина повышением пролиферации ($p < 0,001$). Оценка миграции фибробластов и МСК кожи и ПЖК осуществлялась методом «культуральной раны», с анализом изображений при помощи пакета программ ZEN (Carl-Zeiss). Изучение миграции методом «царапины» показало, что среднее расстояние, преодолеваемое фибробластами и МСК кожи, инкубируемыми в условиях стандартной питательной среды, за 24 часа составило $244,8 \pm 13$ мкм. У клеток ПЖК на стандартной среде тот же показатель составил $133,1 \pm 12$ мкм. У каждого из типов культур клеток (кожи и ПЖК) инкубация в условиях добавления серотонина привела к повышению условной скорости миграции клеток. Так, за исследуемый период времени среднее расстояние миграции клеток кожи в условиях добавления серотонина составило $249,6 \pm 7$ мкм, клеток ПЖК — $209,6 \pm 11,4$ мкм. Подсчет количества мигрировавших клеток показал аналогичные результаты, указывающие на повышение условной скорости перемещения адгезированных МСК и прогениторных клеток кожи и подкожной клетчатки в условиях добавления серотонина.

Список литературы

1. Di Giovanni G., De Deurwaerdère P. Serotonin research: crossing scales and boundaries // *Neuropharmacology*. 2020. Vol. 181. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108340
2. Lin L, Hu K. Serotonin is a multifaceted player in the immune response // *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2021. Vol. 26, N 8. P. 253–254. doi: 10.52586/4939

Чижикова Г.А. ✉, Бильдюг Н.Б.

Влияние коллагена IV на смену изоформ актина в мезенхимных стволовых клетках человека

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

✉ g.a.chizhikova@yandex.ru

Аннотация. Цель работы заключалась в изучении влияния коллагена IV на кардиогенный потенциал мезенхимных стволовых клеток (МСК). Анализ с помощью методов иммунофлуоресценции и вестерн-блоттинга показал, что коллаген IV стимулирует смену изоформ актина в двух линиях МСК человека, способствуя повышению их кардиогенного потенциала.

Ключевые слова: МСК; кардиогенная дифференцировка; изоформы актина; коллаген IV.

Chizhikova G.A., Bilydug N.B.

Effect of collagen IV on actin isoform switching in human mesenchymal stem cell

Institute of Cytology, RAS, Saint Petersburg

Abstract. The work was aimed at studying the effect of collagen IV on the cardiogenic potential of mesenchymal stem cells (MSC). Immunofluorescence and Western blot analysis have shown that collagen IV stimulates actin isoform switching in two human MSC lines and may enhance their cardiogenic potential.

Keywords: MSCs; cardiogenic differentiation; actin isoforms; collagen IV.

В ходе дифференцировки кардиомиоцитов в ткани сердца происходит координированная смена изоформ актина — ключевого белка сократительного аппарата клеток. При этом на ранних сроках наблюдается временная экспрессия гладкомышечного альфа-актина (α SMA), который характерен для гладких мышц сосудов и миоэпителиальных клеток. Считается, что его включение в сократительные структуры является обязательным условием для прохождения дальнейшей кардиогенной дифференцировки, в ходе которой происходит замещение α SMA на более позднюю изоформу — сердечный альфа-актин (α CAA) — с формированием зрелого сократительного аппарата кардиомиоцитов [1]. Важным регулятором кардиогенеза *in vivo* является внеклеточный матрикс (ВКМ). Показано, что использование белков ВКМ, характерных для ткани сердца, может повышать эффективность методов кардиогенной дифференцировки стволовых клеток [2]. Известно, что помимо общего ВКМ кардиомиоциты обладают собственной базальной мембраной, представляющей собой высокоорганизованный слой белков ВКМ на внешней поверхности сарколеммы, который состоит главным образом из ламининов и коллагена IV [3]. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в оценке изолированного эффекта коллагена IV на кардиогенный потенциал мезенхимных стволовых клеток (МСК). Для этого проводили анализ изоформ актина в двух линиях МСК человека из разных источников (линии FetMSC и M-FetMSC, получены из ЦКП «КККП» Института цитологии РАН), при их культивировании на коллагене IV. С помощью метода иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии было показано, что культивирование клеток FetMSC на коллагене IV приводит к появлению интенсивной диффузной окраски цитоплазмы на α SMA, которая практически отсутствует в контрольных клетках, культивируемых в отсутствие белков ВКМ. Результаты вестерн-блоттинга подтвердили повышение уровня α SMA в клетках FetMSC на коллагене IV, а также показали появление поздней изоформы актина, α CAA. В отличие от FetMSC, в контрольных клетках M-FetMSC наблюдалась значительная диффузная окраска цитоплазмы

на α SMA. При этом при культивировании этих клеток на коллагене IV наблюдалось перераспределение гладкомышечного актина с его включением в состав сократительных структур. Результаты вестерн-блоттинга показали снижение уровня α SMA в клетках M-FetMSC на коллагене IV, а также значительное повышение уровня α САА, что может указывать на процесс кардиогенной дифференцировки, сопровождающийся формированием сократительного аппарата с активным замещением гладкомышечного актина зрелой изоформой. В целом, результаты работы свидетельствуют о том, что коллаген IV стимулирует смену изоформ актина в МСК человека и может способствовать повышению их кардиогенного потенциала.

Список литературы

1. Ruzicka D.L., Schwartz R.J. Sequential activation of alpha-actin genes during avian cardiogenesis: vascular smooth muscle alpha-actin gene transcripts mark the onset of cardiomyocyte differentiation // *J Cell Biol.* 1988. Vol. 107, N 6. P. 2575–2586. doi: 10.1083/jcb.107.6.2575
2. Higuchi S., Lin Q., Wang, J., et al. Heart extracellular matrix supports cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells // *J Biosci Bioeng.* 2013. Vol. 115, N 3. P. 320–325. doi: 10.1016/j.jbiosc.2012.10.004
3. Yurchenco P.D., Amenta P.S., Patton B.L. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens // *Matrix Biol.* 2004. Vol. 22, N 7. P. 521–538. doi: 10.1016/j.matbio.2003.10.006

Шангина О.Р.¹✉, Мусина Л.А.¹, Чеканова А.А.², Сельский Н.Е.³

Аллотрансплантация соединительнотканых биоматериалов в проекции дентального имплантата

¹ ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Уфа, Россия

² ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» МЗ РФ, Екатеринбург, Россия

³ ООО «Центр стоматологии и дентальной имплантации профессора Сельского», Уфа, Россия

✉ allookga@mail.ru

Аннотация. Аллотрансплантаты из перикарда, широкой фасции бедра и твердой мозговой оболочки, пересаженные в проекции дентального имплантата для утолщения десны, замещаются адекватным соединительнотканым регенератом, формируя фенотип «толстой» десны, без признаков воспалительных процессов в отличие от аутотрансплантатов слизистой десны.

Ключевые слова: аллотрансплантаты; дентальная имплантация; ткани десны; регенерация.

Shangina O.R.¹, Musina L.A.¹, Chekanova A.A.², Selskiy N.E.³

Allotransplantation of connective tissue biomaterials in the projection of a dental implant

¹ Federal State Budgetary Education Institution of Higher Education “Bashkir State Medical University”, Ufa, Russia

² Federal State Budgetary Institution of Higher Education “Urals State Medical University”, Ekaterinburg, Russia

³ LLC “Center of Dentistry and dental implantation of Professor of Selskiy”, Ufa, Russia

Abstract. Allografts from the pericardium, wide fascia of the femur and dura mater, transplanted in the projection of a dental implant to thicken the gums, are replaced by adequate connective tissue regeneration, forming a phenotype of “thick” gums, without signs of inflammatory processes, unlike autografts of the gingival mucosa.

Keywords: allografts; dental implantation; gum tissue; regeneration.

Восстановление параметров альвеолярной кости и мягких тканей в зоне отсутствующего зуба при имплантации является весьма актуальной проблемой современной стоматологии [1, 2]. Толщина кератинизированной десны должна быть не менее 1,5 мм, при толщине десны менее 1,5–2,0 мм просвечивает любая установленная конструкция. Цель исследования — морфологический анализ биоптатов десны пациентов после аллотрансплантации различных видов соединительнотканых биоматериалов в сравнении с ауто-трансплантацией слизистой десны. Гистологическими и морфометрическими методами исследован материал от 120 пациентов через 6 месяцев после операции. Измеряли толщину тканей десны в месте имплантации (при общем увеличении микроскопа ×40). Пациентов разделили по 30 человек в группе: с использованием аллотрансплантата перикарда (АТП), аллотрансплантата широкой фасции бедра (АТШФБ), аллотрансплантата твердой мозговой оболочки (АТМО) и ауто-трансплантата слизистой с бугра верхней челюсти (АУТ). Приживление АУТ сопровождалось выраженным воспалительным процессом как в строме, так и в эпителии тканей десны. Такое воспаление приводит обычно к рубцеванию слизистой или оголению альвеолярной кости. АТП, АТШФБ и АТМО, пересаженные в проекции имплантата для утолщения десны, через 6 месяцев полностью замещались без признаков воспалительных процессов адекватным соединительнотканым регенератом, покрытым полноценным эпителиальным слоем. Слизистая десны в зоне операции имела типичное строение. Соединительная ткань стромы десны в зоне операции во всех случаях была представлена плотной оформленной волокнистой соединительной тканью, которая была хорошо кровоснабжена, о чем свидетельствовало содержание в тканях большого количества мелких кровеносных сосудов, как капилляров,

так и артериол и венул. Признаков отторжения аллотрансплантатов, сопровождающегося обычно сильно выраженными воспалительными процессами, ни в одном случае не определялось. Морфометрические исследования показали, что при использовании АТШФБ толщина десны составляла $Me = 2,13$ мм ($Q1 = 1,74$ мм, $Q3 = 1,94$ мм). Достаточно близки к нему, но значимо ($p < 0,03$ и $p < 0,04$) более низкими значения были в группах АТП и АТМО ($Me = 1,77$ мм, $Q1 = 1,73$ мм, $Q3 = 1,84$ мм и $Me = 1,77$ мм, $Q1 = 1,69$ мм, $Q3 = 1,85$ мм соответственно), причем различия оказались малозначительными и незначимыми ($p > 0,67$). Таким образом, при использовании аллотрансплантатов из ткани перикарда, широкой фасции бедра и твердой мозговой оболочки для утолщения тканей десны в проекции имплантата у прооперированных пациентов формируется фенотип так называемой «толстой» десны (толщина больше 1,5 мм). Наилучшие результаты были получены при использовании аллотрансплантатов широкой фасции бедра (толщина десны составляла около 2 мм и больше).

Список литературы

1. Sculean A., Gruber R., Dieter D. Soft tissue wound healing around teeth and dental implants // J Clin Periodontal. 2014. Vol. 41, Suppl. 1. P. 6–22. doi: 10.1111/jcpe.12206
2. Bassetti R.G., Stähli A., Bassetti M.A., et al. Soft tissue augmentation around osseointegrated and uncovered dental implants: a systematic review // Clin Oral Investigat. 2017. Vol. 21, N 1. P. 53–70. doi: 10.1007/s00784-016-2007-9

Шарикова Н.А. ✉, Вдовиченко А.Ю.

Электропроводящие высокопористые композиционные материалы для регенеративной медицины

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ nata_glushkova@bk.ru

Аннотация. Электропроводящие трехмерные композиционные материалы способны воссоздать основные свойства нативных органов. Сочетание природного полимера и проводящего наполнителя дает возможность воспроизводить электрические свойства естественного внеклеточного матрикса, что способствует лучшей пролиферации клеток поврежденных тканей.

Ключевые слова: хитозан; ацетат целлюлозы; технический углерод; электропроводящие композиционные материалы; регенеративная медицина.

Sharikova N.A., Vdovichenko A.Yu.

Electrically conductive highly-porous composite materials for regenerative medicine

NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Abstract. Electrically conductive three-dimensional composite materials are capable of recreating the basic properties of native organs. The combination of a natural polymer and conductive filler makes it possible to reproduce the electrical properties of the natural extracellular matrix, which contributes to better proliferation of damaged tissue cells.

Keywords: chitosan; cellulose acetate; carbon black; conductive composite materials; regenerative medicine.

Тканевая инженерия представляет собой междисциплинарную область науки, объединяющую в себе биологию, материаловедение и химию, направленную на восстановление, замену, регенерацию тканей или органов [1]. Важное значение имеют используемые каркасы, которые обеспечивают структурную основу для клеточной активности: адгезии клеток, дифференцировки, роста и передачи сигналов. Для регенерации тканей такие матрицы должны обладать определенными функциональными характеристиками. Наиболее важным свойством является биосовместимость, обеспечивающая интеграцию каркаса в организм и положительный иммунный ответ. Помимо этого имеют значения и механические свойства (эластичность, предел прочности), влияющие на способность матрикса противостоять физиологическим воздействиям [2]. Улучшить регенерацию тканей помогают электропроводящие свойства каркасов, то есть способность воспроизводить электрические сигналы естественного внеклеточного матрикса. Впервые это влияние было показано в 1960-х годах, когда ученые показали, что электрическая стимуляция влияет на формирование костной ткани, а затем нервной, сердечной и мышечной и заживление ран [3]. Так как биосовместимые полимеры в основном являются диэлектриками, то придать необходимые проводящие свойства могут углеродные наполнители, такие как технический углерод, графен, углеродные нанотрубки и др. В данном исследовании полимерными матрицами являлись хитозан (43040 ChitoClear) и ацетат целлюлозы (Sigma Aldrich, США). Оба полимера являются биосовместимыми и биоразлагаемыми, а также обладают хорошими адгезионными свойствами. В качестве проводящей добавки использовали технический углерод (Vulcan XC-72R), концентрация которого варьировалась от 1 до 50 масс. %. Полученные композиционные материалы обладают высокоразвитой пористой поверхностью (97–98%), что подтверждается результатами сканирующей электронной микроскопии

и значениями удельной площади поверхности, полученными методом БЭТ. Пористая система необходима для пролиферации и миграции клеток, обмена питательными веществами и формирования новых тканей. Для определения механических характеристик были проведены испытания образцов на сжатие и по результатам рассчитан модуль упругости. Для композитов на основе хитозана максимальное значение составило 7 МПа при содержании наполнителя 7 масс. %, а на основе ацетата целлюлозы — 10 МПа, при наполнении 38 масс. % техническим углеродом. Полученные значения близки к модулю упругости костной и хрящевой тканей. Электропроводящие свойства композиционных материалов исследовались по результатам полученных на диэлектрическом спектрометре Novocontrol Alpha-A импедансных спектров. Для каждого образца были получены частотные зависимости электропроводности. При небольшом наполнении они представляют собой наклонные прямые, однако при определённых концентрациях технического углерода принимают вид горизонтальной прямой, что характерно для проводящих систем. Также построены зависимости электропроводности от содержания технического углерода в различных полимерных матрицах, и аппроксимацией S-образной (сигмоидальной) кривой определен порог перколяции в каждой системе. В случае наполнения хитозановой матрицы значение порога составило 35 масс. %, а максимальное значение электропроводности порядка 10^{-2} См/м. Для ацетата целлюлозы — 15 масс. % и максимум около 10^{-3} См/м. Полученные значения электропроводности композитов схожи с показателями сердечной, костной и мышечной тканей, извлеченных из крыс [3]. Таким образом, разработанные в данной работе электропроводящие композиционные материалы на основе биосовместимых полимеров возможно применять в качестве каркасов для регенерации клеток различных типов тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение 075-15-2023-324) с использованием оборудования ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Chandra P.K., Soker S., Atala A. Tissue engineering: current status and future perspectives. In: Lanza R., Langer R., Vicenty J.P., et al, editors. Principles of tissue engineering. Academic Press, 2020. P. 1–35. doi: 10.1016/B978-0-12-818422-6.00004-6
2. Abd G., Díaz R.S., Gupta A., et al. Carbon nanomaterials-based electrically conductive scaffolds for tissue engineering applications // MedComm—Biomaterials and Applications. 2024. Vol. 3, N 2. doi: 10.1002/mba2.76
3. Mostafavi E., Medina-Cruz D., Kalantari K., et al. Electroconductive nanobiomaterials for tissue engineering and regenerative medicine // Bioelectricity. 2020. Vol. 2, N 2. P. 120–149. doi: 10.1089/bioe.2020.0021

Шариков Р.В. ✉, Стрельцов Д.Р., Малахов С.Н., Бакиров А.В., Тенчурин Т.Х., Богуш В.Г., Чвалун С.Н.

Исследование физико-механических свойств материалов для регенеративной медицины на основе рекомбинантных спидроинов

НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

✉ sharikov_rv@nrcki.ru

Аннотация. Биомедицинские изделия из полимерных нетканых волокнистых материалов способны замещать ткани и органы в живом организме. Рекомбинантные спидроины обладают уникальными особенностями: высокой биосовместимостью и физико-механическими характеристиками, однако эти свойства напрямую зависят от надмолекулярной организации белков в материале.

Ключевые слова: рекомбинантные спидроины; тканевая инженерия; электроформование; волокнистые нетканые материалы; полимерные материалы; структурные превращения; надмолекулярная организация.

Sharikov R.V., Streltsov D.R., Malakhov S.N., Bakirov A.V., Tenchurin T.Kh, Bogush V.G., Chvalun S.N.

Study of physical and mechanical properties of materials for regenerative medicine based on recombinant spidroins

NRC "Kurchatov Institute", Moscow, Russia

Abstract. Biomedical products made from polymer non-woven fibrous materials are capable of replacing tissues and organs in a living organism. Recombinant spidroins have unique features: high biocompatibility and physical and mechanical characteristics, but these properties directly depend on the supramolecular organization of proteins in the material.

Keywords: recombinant spidroins; tissue engineering; electrospinning; fibrous nonwoven materials; polymeric materials; structural transformations; supramolecular organization.

В настоящее время большое внимание как в современной медицине, так и в регенеративной привлекает использование природных полимеров, таких как полисахариды и белки. До сих пор в клинической практике наиболее часто используемыми терапевтическими подходами послеоперационного лечения были традиционные раневые повязки, в том числе марля, бинты и кремы, которые действуют как временные барьеры. Особенный интерес в современной медицине представляют кожные трансплантаты. Однако большинство из них требуют частой замены, достаточно дорогие и не способны полностью восстановить структуру и функции кожи [1]. Поэтому разработка новых подходов и материалов, помогающих механизму заживления ран, чрезвычайно актуальна. Среди различных новых перевязочных материалов для ран нановолокнистые мембраны привлекают все большее внимание из-за таких присущих им свойств, как высокое отношение поверхности к объему, взаимосвязанные поры, способствующие проникновению клеток и питательному обмену, фазе гемостаза и абсорбции раневого экссудата [2]. Кроме того, нановолокна имитируют структуру белков природного внеклеточного матрикса (ВКМ) [3]. Однако особый интерес вызывает к себе паучий шелк — спидроин. Структурообразование спидроинов представляет собой сложный процесс, включающий в себя молекулярные и надмолекулярные перестройки. Более того, пауки способны изменять химическую среду (рН, концентрацию натрия, калия, хлоридов, фосфатов и сульфатов) внутри своих желез и каналов, а также обезвоживать высококонцентрированный белковый раствор во время его движения от железы через проток. Эти процессы, в свою очередь, приводят к структурной реорганизации белков, приводящей

к получению конечного волокна с необходимыми свойствами. Механические свойства шелка паука делают его идеальным материалом для производства тканей нового поколения и композиционных материалов для промышленности, в том числе и для биомедицинской из-за его высокой биосовместимости, эластичности и механической прочности. При этом производство натурального паучьего шелка в больших объемах проблематично. В данной работе исследовали пленочные и нетканые материалы, полученные методом электроформования, на основе рекомбинантных спидроинов rS1/9 и rS2/12 [4]. Были определены оптимальные условия электроформования, способствующие получению бездефектных волокон со средним диаметром в диапазоне 100–200 нм. Методами ИК-спектроскопии и рентгеновского рассеяния продемонстрировано, что большая степень кристалличности наблюдается у материалов, полученных их водных растворов, чем из гексафторизопропанола. Обработка материалов этиловым спиртом приводит к реорганизации молекулярной структуры и увеличению содержания доли β -кристаллитов. Методом силовой спектроскопии показано, что механические свойства индивидуальных волокон зависят как от типа белка, так и от диаметра волокон. Происходит резкое увеличение модуля изгиба волокна до 80 ГПа при уменьшении диаметра ниже 600 нм.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение 075-15-2023-324) с использованием оборудования ресурсных центров НИЦ «Курчатовский институт».

Список литературы

1. Miguel S.P., Figueira D.R., Simões D., et al. Electrospun polymeric nanofibres as wound dressings: a review. *Colloids and surfaces // Biointerfaces*. 2018. Vol. 169. P. 60–71. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.05.011
2. Amaral H.R., Wilson J.A., do Amaral R.J.F.C., et al. Synthesis of bilayer films from regenerated cellulose nanofibers and poly (globalide) for skin tissue engineering applications // *Carbohydr Polym*. 2021. Vol. 252. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.117201
3. Figueira D.R., Miguel S.P., de Sá K.D., et al. Production and characterization of polycaprolactone-hyaluronic acid/chitosan-zein electrospun bilayer nanofibrous membrane for tissue regeneration // *Int J Biol Macromol*. 2016. Vol. 93. P. 1100–1110. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.09.080
4. Tenchurin T.K., Sharikov R.V., Belousov S.I., et al. Effect of recombinant spidroins self-assembly on rheological behavior of their dispersions and structure of electrospun nanofibrous materials // *Polymers*. 2023. Vol. 15, N 14. P. 3001. doi: 10.3390/polym15143001

Шаяхметов Р.И.¹ ✉, Хисматуллина З.Р.²

Связь неоангиогенеза с морфофункциональным состоянием микроокружения мультиформной глиобластомы

¹ Башкирский государственный медицинский университет, Уфа, Россия

² Уфимский университет науки и технологий, Уфа, Россия

✉ sheikhakhmetov@gmail.com

Аннотация. В исследовании, направленном на изучение особенностей кровоснабжения и морфофункционального состояния микроокружения мультиформной глиобластомы, обнаружено, что взаимосвязь между сосудистой пролиферацией и функциональным состоянием глиальных клеток оказывает влияние на гетерогенное развитие опухоли.

Ключевые слова: нейроонкология; мультиформная глиобластома; неоангиогенез; патоморфология глиобластомы.

Shayakhmetov R.I.¹, Khismatullina Z.R.²

The relationship between neoangiogenesis and the morphofunctional state of the microenvironment of glioblastoma multiforme

¹ Bashkir State Medical University, Ufa, Russia

² Ufa University of Science and Technology, Ufa, Russia

Abstract. In a study aimed at investigating the peculiarities of blood supply and morpho-functional state of the microenvironment of glioblastoma multiforme, the relationship between vascular proliferation and the functional state of glial cells was found to influence heterogeneous tumor development.

Keywords: neuro-oncology; glioblastoma multiforme; neoangiogenesis; pathomorphology of glioblastoma.

В настоящее время заболеваемость злокачественными новообразованиями в России по сравнению с 2022 годом увеличилась на 7,6% — 1168,9 случаев на 100 тыс. По итогам 2023 года показатель летальных исходов от онкологических заболеваний составил 194,3 на 100 тысяч населения, что на 1,8% больше, чем в 2022 году. Из всех случаев злокачественных новообразований доля первичных опухолей головного мозга составляет 2% — 8 случаев на 100 тысяч. В возрастной группе до 65 лет церебральные глиомы занимают пятое место среди причин смертности от злокачественных новообразований, а у детей — второе (15–25%) и являются самой обсуждаемой проблемой современной нейроонкологии. Мультиформная глиобластома — высоко агрессивное астроцитарное новообразование мозга, IV степени злокачественности, которое развивается преимущественно в подкорковом белом веществе полушарий головного мозга. Исходя из этого, целью исследования было изучение особенностей кровоснабжения и морфофункционального состояния микроокружения мультиформной глиобластомы. В качестве материала использовали образцы опухолевой ткани, полученные интродоперационным путем у 10 пациентов с подозрением на первичные супратенториальные образования глиального ряда. Приготовление гистологических препаратов включало в себя несколько этапов: взятие материала, фиксация, обезвоживание, промывка, уплотнение, нарезание препарата, окрашивание, просветление и заключение срезов. Морфометрический анализ был проведён с использованием программы TourView. Статистическая обработка полученных данных была выполнена в программе «STATISTICA» v. 8.0. В ходе изучения особенностей кровоснабжения мультиформной глиобластомы были оценены морфофункциональные состояния глиальных клеток опухолевого микроокружения. Так,

образцы с большей площадью кровоснабжения имели высокий показатель митотического индекса и числа наблюдаемых глиоцитов в поле зрения, значительную долю которых составляли плотно расположенные гиперхромные и плеоморфные астроциты. Перфузия обеспечивалась дезорганизованной сетью полно-кровных капилляров с несформированной эндотелиальной стенкой и высокой проницаемостью. Опухоли с менее выраженной гемоциркуляцией отличались малочисленностью глиальных клеток в поле зрения, с преобладанием гипохромных и нормохромных астроцитов, а также высоким индексом апоптоза. Кроме того, имелись признаки воспаления на фоне сетчатого отёка и очагов некроза. Кровоток осуществлялся в основном капиллярами малого кровенаполнения, имеющими склерозированную стенку и признаки тромбообразования. Согласно литературным данным, в результате сигнальных и механических воздействий на окружающие клетки, опухоль генерирует условия, необходимые для прогрессирования заболевания. На начальных этапах роста новообразования кровоснабжение обеспечивается первичными сосудами, которые в последующем вовлекаются в кооптацию из-за миграции и митозов опухолевых клеток. Нехватка кровоснабжения для стремительно растущей глиобластомы стимулирует выработку фактора, инициируемого гипоксией 1 (HIF-1), который способствует транскрипции сигнальных белков, таких как VEGF, ARL13B, TGF- β , FGF и EGF. Взаимодействие этих белков с мембранным рецептором эндотелиоцитов приводит к деградации базальной мембраны и экстрацеллюлярного матрикса, смещению фибробластов и инвазии эндотелиальных клеток в строму [1]. В последующем активные эндотелиальные прогениторные клетки формируют базальную мембрану и капилляр с включением перицитов, эндотелиальных и гладкомышечных клеток. Однако гиперпродукция опухолевыми клетками неоангиогенных факторов, связанных с развитием отёка и местного воспаления с привлечением иммунных клеток, приводит к формированию сосудистой сети с нарушенной архитектурой [2]. Неоангиогенные сосуды обладают высокой проницаемостью из-за разрывов базальной пластинки и больших промежутков между эндотелиоцитами. Отсюда в опухолевой ткани возникают очаги кровоизлияния, сопровождающиеся тромбообразованием и разрушением стенки мелких и средних капилляров. Стимуляция неоангиогенеза приводит к образованию дезорганизованной сосудистой сети с аномальной структурой. Такие капилляры способствуют прогрессированию и инвазии опухолевых клеток, однако являются нестабильными и малофункциональными. Проведённое исследование показывает, что особенности сосудистой пролиферации коррелируют с морфофункциональным состоянием микроокружения мультиформной глиобластомы.

Список литературы

1. Rosińska S., Gavard J. Tumor vessels fuel the fire in glioblastoma // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 12. P. 6514. doi: 10.3390/ijms22126514
2. Hovis G., Chandra N., Kejriwal N., et al. Understanding the role of endothelial cells in glioblastoma: mechanisms and novel treatments // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, N 11. P. 6118. doi: 10.3390/ijms25116118

Шевелева О.Н.¹ ✉, Протасова Е.А.¹, Буторина Н.Н.¹, Медведев С.П.², Григорьева Е.В.², Лядова И.В.¹

Влияние интерферона β на эктодермальную дифференцировку индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

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

² ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ on_sheveleva@mail.ru

Аннотация. В данном исследовании были получены и охарактеризованы индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека с конститутивной гиперэкспрессией интерферона β (IFNB-иПСК). При повышенном уровне IFNB в IFNB-иПСК и при применении экзогенного IFNB наблюдалось снижение способности к дифференцировке в нейроэктодерму.

Ключевые слова: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК); интерферон β (IFNB); эктодермальная дифференцировка; гиперэкспрессия; CRISPR/Cas9.

Sheveleva O.N.¹, Protasova E.A.¹, Butorina N.N.¹, Medvedev S.P.², Grigor'eva E.V.², Lyadova I.V.¹

Effect of interferon β on ectodermal differentiation of human induced pluripotent stem cells

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. In this study, induced pluripotent stem cells with constitutive overexpression of interferon β (IFNB-IPSCs) were obtained and characterized. At the increased level of IFNB in IFNB-IPSCs and upon application of exogenous IFNB, a decrease in the ability to differentiate into neuroectoderm was observed.

Keywords: induced pluripotent stem cells (iPSC); interferon β (IFNB); ectodermal differentiation; overexpression; CRISPR/Cas9.

Получение генетически модифицированных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) человека является очень актуальной задачей в настоящее время. Модифицированные иПСК открывают новые возможности в моделировании заболеваний *in vitro*, апробации различных терапевтических подходов и в получении соматических клеток, которые трудно поддаются редактированию, например макрофаги, нейроны и другие.

В настоящем исследовании мы показали возможность получения иПСК человека с конститутивной гиперэкспрессией интерферона β (IFNB). Взяв за основу иПСК линии K7-4Lf (K7-иПСК, [Malakhova et al., 2020]), полученную ранее из моноцитов крови здорового донора, и применив систему CRISPR/Cas9, мы получили несколько линий иПСК с конститутивной экспрессией IFNB (IFNB-иПСК). Хотя уровень экспрессии IFNB в этих линиях варьировал, он был стабильно выше, чем в родительских линиях в среднем в 51.8 и 27.8 раза (для гомозиготных линий LA8 и LC8 соответственно), и сохранялся на высоком уровне при пассировании иПСК (по крайней мере до 28 пассажа). Экспрессия интерферона β была подтверждена на уровне белка с применением вестерн-блоттинга, а функциональность секретируемого IFNB доказана в экспериментах с действием супернатантов от IFNB-иПСК на макрофаги человека, полученные из THP1. IFNB-иПСК обладали всеми характерными особенностями иПСК — описанной для этих клеток и их колоний морфологией, экспрессией щелочной фосфатазы, экспрессией маркеров плюрипотентности (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*) и способностью дифференцироваться в три зародышевых листка, что было доказано иммуноцитохимическим окрашиванием спонтанно образующихся эмбрионидных телец на AFP (энтодерма), ACTA2 (мезодерма) и TUBB3 (эктодерма).

Однако при сравнении экспрессии маркеров производных трех зародышевых листков, полученных при спонтанной дифференцировке IFNB-иПСК и родительских K7-иПСК, мы обнаружили, что в линиях с оверэкспрессией интерферона β наблюдается подавление экспрессии ранних нейроэктодермальных генов (*PAX6*, *LHX2*). В дальнейших экспериментах эти данные подтвердились и при спонтанной дифференцировке K7-иПСК и при направленной дифференцировке K7-иПСК (в среде STEMdiff™ Trilineage Ectoderm Medium, #05230, StemCell) в присутствии экзогенного интерферона.

Таким образом, мы разработали модель, позволяющую исследовать влияние оверэкспрессии интерферона β на раннее развитие, и показали его негативное влияние на развитие нейроэктодермы, приводящее, по крайней мере, к нарушению экспрессии играющих важную роль в развитии *PAX6* и *LHX2*. В дальнейшем мы планируем расширить эти исследования в отношении других ключевых эктодермальных маркеров и учесть влияние интерферона β на формирование мезодермы и энтодермы.

Работа осуществлялась при поддержке Минобрнауки РФ, проект № 075-15-2021-1075.

Список литературы

1. Malakhova A.A., Grigor'eva E.V., Pavlova S.V., et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines ICGi021-A and ICGi022-A from peripheral blood mononuclear cells of two healthy individuals from Siberian population // Stem Cell Res. 2020. Vol. 48. doi: 10.1016/j.scr.2020.101952

Шеденкова М.О.^{1,2} ✉, Салихова Д.И.^{1,2}, Некрасова А.А.³, Бакаева З.В.³, Гольдштейн Д.В.^{1,2}

Нейропротективное действие внеклеточных везикул глиальных клеток-предшественников человека, опосредованное активацией PI3K-Akt сигнального пути

¹ НИИ молекулярной и клеточной медицины медицинского института ФГАУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва

² ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени Н.П. Бочкова», Москва

³ ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России Москва

✉ margarita.shedenkova@gmail.com

Аннотация. В данной работе впервые продемонстрирована нейропротекторная роль внеклеточных везикул глиальных клеток-предшественников человека на модели глутаматной эксайтотоксичности. Также показано, что их нейропротекторное действие связано с внутривезикулярными белками, которые активируют в клетках PI3K-Akt сигнальный путь.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы; глиальные клетки-предшественники; протеом; нейропротекция; глутаматная эксайтотоксичность; iPSC.

Shedenkova M.O.^{1,2}, Salikhova D.I.^{1,2}, Nekrasova A.A.³, Bakaeva Z.V.³, Goldshtein D.V.^{1,2}

Neuroprotective effect of extracellular vesicles of human glial progenitor cells mediated by activation of PI3K-Akt signaling pathway

¹ RUDN University, Moscow, Russia

² Research Centre for Medical Genetics, Moscow, Russia

³ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

Abstract. This work demonstrates the neuroprotective role of extracellular vesicles of human glial progenitor cells in a model of glutamate excitotoxicity for the first time. It also shows that their neuroprotective effect is associated with intravesicular proteins that activate the PI3K-Akt signaling pathway in cells.

Keywords: extracellular vesicles; glial progenitor cells; proteome; neuroprotection; glutamate excitotoxicity; iPSCs.

Согласно ежегодной статистике Всемирной организации здравоохранения нейродегенеративные заболевания стоят на 7-м месте в списке причин смерти пациентов. Несмотря на уникальность причин возникновения, механизмы их патофизиологии схожи. Одним из самых распространенных нарушений является дисрегуляция глутамата [1]. Поэтому разработка и поиск новых препаратов, действие которых основано на защите от глутаматной токсичности, остается актуальной задачей. Целью данного проекта является изучение механизмов нейропротективного действия внеклеточных везикул, полученных из глиальных производных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ВВ-ГКП), с помощью комбинированной работы протеомного и ингибиторного анализов на модели глутаматной эксайтотоксичности.

Методы: Культуры глиальных клеток-предшественников были получены ранее от здорового донора путем дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в глиальном направлении [2]. Препараты ВВ-ГКП получали и анализировали согласно методике, описанной ранее [3]. Для постановки модели глутаматной эксайтотоксичности использовалась первичная культура кортикальных нейронов из крысят линии Wistar (P1-2). На 10-е сутки культивирования добавляли препараты ВВ-ГКП. На следующий день

осуществляли постановку модели глутаматной эксайтотоксичности, согласно указанной методике [4]. Согласно результатам протеомного анализа в препарате везикул присутствовали белки, принадлежащие PI3K-Akt сигнальному пути. В связи с этим было решено подтвердить активацию этого пути с использованием ингибиторного анализа. Для этого использовали селективный ингибитор субъединицы PI3K PI3K γ — AS605240 (1 мкг/мл). Оценку выживаемости проводили с помощью МТТ-теста. Для статистической обработки данных (односторонний тест ANOVA с пост-хок тестом Холм-Шидака и поправкой на множественные сравнения) использовали программу SigmaPlot 12.5. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Для протеомного анализа внеклеточных везикул вначале проводили трипсинолиз препаратов. Полученные пептидные фракции растворяли в 3%-ном ацетонитриле, содержащем 0,1% TFA, и наносили на колонку с сорбентом Aeris Peptide XB-C18 2.6 μ m. Разделение пептидов проводили с использованием хроматографической системы Ultimate 3000 Nano LC System, сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF посредством наноэлектроспрейного источника. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 15 MS/MS-сканирований (метод topN). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который был проанализирован программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01) с использованием базы данных UniProtKB, таксон Homo Sapiens. Полученный список белков анализировали с помощью программы String 8.11.

Результаты: На модели глутаматной эксайтотоксичности при добавлении 100 мкМ глутамата наблюдали снижение числа жизнеспособных кортикальных нейронов на $37.5 \pm 4.03\%$ по сравнению с группой контроля (100%). Добавка препарата ВВ-ГКП (10 мкг/мл) в присутствии глутамата увеличивала количество жизнеспособных клеток до контрольных значений ($p < 0,001$).

С целью исследования механизмов нейропротективного действия ВВ-ГКП провели протеомный анализ. Белки, обнаруженные в препарате, были категоризированы согласно их участию в биологических процессах. Среди групп биологических процессов наиболее представленными являются категории: «метаболические процессы» (60%), «клеточная коммуникация» (26%); «негативная регуляция клеточной гибели» (9%); «окислительно-восстановительные процессы» (8%); «ответ на снижение уровня кислорода» (6%); «позитивная регуляция нейрогенеза» (5%); «NIK-Nf-kB сигналинг» (4%) и «регенерация» (2%).

Также белки проанализировали по базе данных — KEGG, с целью выявления активирующихся сигнальных путей. Наиболее представленным по количеству белков (51 белок) был «PI3K-Akt сигнальный путь», который является одним из основных путей, способствующих выживанию нейроглиальных клеток при нейротоксичности. Из проанализированных белков можно выделить, например: субъединицы рецепторов ITGA и ITGB, а также обе субъединицы HSP90 и все субъединицы белка Ras, которые состоят в комплексе активатора АКТ.

Для подтверждения активации данного пути внутри клеток провели ингибиторный анализ. Он показал, что присутствие AS605240 (1 мкг/мл) одновременно с ВВ-ГКП на модели глутаматной эксайтотоксичности снижало нейропротекторный эффект до значений как в группе только с глутаматом ($p < 0,001$).

Выводы: Полученные данные свидетельствуют о том, что препарат ВВ-ГКП обладает нейропротекторными свойствами при глутаматной эксайтотоксичности. Это происходит благодаря содержащимся в них белкам, активирующим протекторные сигнальные пути, среди которых удалось подтвердить участие сигнального пути PI3K-Akt. Эти результаты позволяют предположить, что ВВ-ГКП могут стать новым видом терапевтического препарата для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-15-00362 «Изучение механизмов терапевтического действия внеклеточных везикул, полученных из глиальных клеток предшественников человека на модели болезни Альцгеймера».

Список литературы

1. Andersen J.V., Markussen K.H., Jakobsen E., et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration // *Neuropharmacology*. 2021. Vol. 196. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108719
2. Salikhova D., Bukharova T., Cherkashova E., et al. Therapeutic effects of hipsc-derived glial and neuronal progenitor cells-conditioned medium in experimental ischemic stroke in rats // *Int J Mol Sci*. 2021. Vol. 22, N 9. P. 4694. doi: 10.3390/ijms22094694

3. Turovsky E.A., Golovicheva V.V., Varlamova E.G., et al. Mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles afford neuroprotection by modulating PI3K/AKT pathway and calcium oscillations // *Int J Biol Sci.* 2022. Vol. 18, N 14. P. 5345–5368. doi: 10.7150/ijbs.73747
4. Zgodova A., Pavlova S., Nekrasova A., et al. Isoliquiritigenin protects neuronal cells against glutamate excitotoxicity // *Membranes.* 2022. Vol. 12, N 11. P. 1052. doi: 10.3390/membranes12111052

Шелег С.А. ✉, Куренкова А.Д., Файзуллин А.Л., Ефремов Ю.М., Тимашев П.С.

Оценка возможности использования рёберного хряща для мозаичной хондропластики коленного сустава у крыс

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

✉ sonchesshel@yandex.ru

Аннотация. Показано, что гиалиновый рёберный хрящ может быть альтернативным источником ткани при хондропластике коленного сустава, поскольку обладает схожим составом и механическими свойствами. Для улучшения интеграции графта и уменьшения воспаления может быть использован фибриновый гель с хондроцитами.

Ключевые слова: восстановление хряща; рёберный графт; рёберные хондроциты; фибриновый гель; остеохондральный дефект; мозаичная хондропластика; тканевая инженерия хряща.

Sheleg S.A., Kurenkova A.D., Faizullin A.L., Efremov Yu.M., Timashev P.S.

Assessment of costal cartilage as a viable option for mosaicoplasty of the knee joint

Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

Abstract. It has been demonstrated that hyaline costal cartilage can serve as an alternative tissue source for knee joint chondroplasty, as it shares similar composition and mechanical properties. To enhance graft integration and reduce inflammation, a fibrin gel with chondrocytes may be utilized.

Keywords: cartilage repair; fibrin gel; costal graft; costal chondrocytes; osteochondral defect; mosaicoplasty; cartilage tissue engineering.

Хрящевая ткань обладает ограниченной способностью к регенерации, что обуславливает нарушение функциональности суставов и инвалидизацию пациентов с локальными повреждениями. К эффективным методам восстановления хрящей относят мозаичную хондропластику и аутологичную трансплантацию хондроцитов. Одним из ограничений данных технологий является необходимость получения интактного хряща из неповрежденных участков. Альтернативным источником материала является реберный хрящ, поскольку он способен выдерживать характерную для сустава нагрузку за счет сходной структуры, состава и механических свойств [1]. На сегодняшний день реберно-хрящевой аутографт широко применим для реконструкции височно-нижнечелюстного сустава, однако восстановление дефектов коленного сустава с помощью реберного хряща пока не имеет широкого применения из-за плохой интеграции трансплантата.

Целью настоящей работы стала разработка протокола аутологичной хондропластики с помощью ребра на модели дефекта хряща коленного сустава крысы. Для преодоления проблемы интеграции тканей использовали фибриновый клей, содержащий рёберные хондроциты.

В первой части работы был разработан механо-ферментативный метод выделения хондроцитов рёберного хряща крысы. Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что полученная первичная культура на 99,91% состояла из Sox9 позитивных клеток, что говорит о высокой степени чистоты популяции. После непродолжительного культивирования в течение суток оценивали выживаемость различных концентраций хондроцитов в фибриновом клее. Плотность клеток 250 кл/мкл была определена как оптимальная и использовалась далее в экспериментах *in vivo*. В связи с тем, что механические свойства хряща сустава определяются особым расположением коллагеновых волокон, ориентация трансплантируемого графта

может определять способность нести нагрузку. С помощью поляризационной микроскопии было определено, что коллаген в рёберном хряще ориентирован в дорсо-вентральном направлении. При этом механические тесты показали, что несмотря на то, что модуль Юнга при сжатии во всех плоскостях не отличается, в медиалатеральном направлении ребро обладает высокой деформационной способностью и хорошо адаптируется к различным нагрузкам. Таким образом, дорсо-вентральное и медиалатеральное направления могут быть оптимальными, и выбор будет зависеть от требуемого размера графта и необходимости наличия костной части.

Эксперименты *in vivo* включали в себя хондропластику коленного сустава крысы с помощью аутологичного рёберного графта. С целью эффективного закрепления трансплантата в дефекте использовали фибриновый гель с реберными хондроцитами или без них. В качестве контроля использовали дефект коленного сустава без трансплантата и ложноперированный сустав. Сравнительная оценка интеграции трансплантата и структуры новообразованной ткани в группах проводилась с помощью компьютерной томографии, гистологического и иммуногистохимического анализа через 1 месяц после операции.

Оценка полученных на микроКТ 3D реконструкций и гистологических срезов коленных суставов крыс выявила отсутствие интеграции аутографта в 1 из 5 случаев в группе животных с бесклеточным фибриновым гелем, тогда как в группе фибринового клея с клетками интеграции не наблюдалось в 2 из 5 случаев, различие не было статистически значимым. Стоит отметить, что в группе фибринового клея без клеток наблюдалось разрастание синовиальной мембраны в 2 случаях из 5, однако при использовании клея с клетками этого не наблюдали ни в одном из образцов. У контрольных животных с дефектом без трансплантата синовит также наблюдали в половине случаев.

Иммуногистохимическое окрашивание показало положительное окрашивание всех трансплантатов на маркер гиалинового хряща коллаген II типа и Sox9 и отсутствие окрашивания на маркер фиброза коллаген I типа во всех группах, что говорит о сохранении структуры реберного хряща через 1 месяц. При этом у всех животных с интегрированным графтом (7 крыс) наблюдали восстановление конгруэнтности поверхности сустава, в то время как в контроле дефект не был заполнен тканью.

Таким образом, использование фибринового клея с клетками не влияет на интеграцию графта, однако позволяет снизить воспаление в суставе. Обобщая вышесказанное, реберный графт обладает высокими механическими свойствами, а также способен восстанавливать поверхность хряща, что делает метод мозаичной хондропластики с помощью реберного трансплантата перспективным для использования в клинике.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-75-01066.

Список литературы

1. Farinelli L., Aquili A., Manzotti S., et al. Characterization of human costal cartilage: is it an adapt tissue as graft for articular cartilage repair? // J Biol Regul Homeost Agents. 2019. Vol. 33. N 2.
2. XIX Congresso Nazionale S.I.C.O.O.P. Societ.

Шептий В.В.^{1,2}, Брускин С.А.¹, Золотаренко А.Д.¹✉

Миниатюрная нуклеаза Un1Cas12f1 — эффективный инструмент для редактирования генома

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ zalenkainbox@gmail.com

Аннотация. Нами созданы конструкции для сравнения активности SpCas9 и компактной нуклеазы Un1Cas12f1 в клетках млекопитающих. Un1Cas12f1 в 2,5 раз меньше, что облегчает ее доставку. Нуклеазы показали сходную активность при внесении разрывов и репарации на основе NHEJ и встраивание фрагментов по пути HDR.

Ключевые слова: геномное редактирование; Cas9; Un1Cas12f1; Cas14a.

Sheptiy V.V.^{1,2}, Bruskin S.A.¹, Zolotareno A.D.¹

Miniature nuclease Un1Cas12f1 — an efficient tool for genome editing

¹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. In this research we compared the activity of the nucleases SpCas9 and Un1Cas12f1 in mammalian cells. Un1Cas12f1 is 2,5 times smaller than SpCas9, which facilitates the delivery. The analyzed nucleases showed similar activity of NHEJ, and the capability of the HDR-mediated repair.

Keywords: genome editing; Cas9; Un1Cas12f1; Cas14a.

В последние годы редактирование генома и генная терапия стали одними из наиболее активно развивающихся технологий в молекулярной биологии. Широко изучается применение направляемых нуклеаз, таких как SpCas9, для редактирования геномов, внесения, удаления или модификации различных локусов. В свою очередь, генная терапия может заключаться как в доставке копии гена, образующей функциональный белок, так и в редактировании мутантного аллеля, его удалении или доставке активатора/репрессора, регулирующего экспрессию гена, важного для патогенеза заболевания. Этот подход актуален для ферментозаместительных терапий, а также для таких заболеваний, как муковисцидоз, мышечная дистрофия, буллезный эпидермолиз и многих других, для которых традиционные методы лечения малоэффективны.

Одним из ограничений применения нуклеазы SpCas9 в генной терапии является большой размер ее кодирующей последовательности (4.1 т.п.н.), за счет чего затруднена терапевтическая доставка нуклеазы в клетки. В то же время изучаются разнообразные более компактные нуклеазы, размеры которых позволяют доставлять их в клетки млекопитающих путем трансдукции аденоассоциированными вирусами (AAV), например Cas12a (3.6 т.п.н.), SaCas9 (3.2 т.п.н.), NmCas9 (3.2 т.п.н.), CasX (3 т.п.н.), CasPhi (3 т.п.н.), CjCas9 (2.9 т.п.н.) и др. Такой метод доставки на сегодняшний день является одним из наиболее перспективных, поскольку рекомбинантные AAV непатогенны для человека, имеют низкую иммуногенность, характеризуются сниженным риском инсерционного мутагенеза по сравнению с другими типами вирусов, используемых для терапевтической доставки трансгенов. Кроме того, существуют серотипы, различающиеся по тропизму к различным типам клеток, что позволяет осуществлять направленную доставку.

В данной работе мы изучали миниатюрную нуклеазу Un1Cas12f1 (Cas14a), которая имеет размер 529 а.к. (1.6 т.п.н.) и является одной из наиболее компактных направляемых нуклеаз, для которых была показана

активность в отношении двуцепочечной ДНК в клетках млекопитающих. Данная нуклеаза отличается от SpCas9 последовательностью PAM-сайта (TTTV), а также образованием липких концов после разрезания мишени, что потенциально может способствовать более высокому проценту редактирования с репарацией повреждений на основе гомологичной рекомбинации (HDR) в присутствии донорных последовательностей.

Мы создали конструкции для экспрессии изучаемой нуклеазы и оптимизированного компактного скаффолда в клетках млекопитающих и сравнили ее активность с широко применяемым ферментом SpCas9. Изучаемые конструкции показали близкие уровни активности при редактировании целевых локусов. Кроме того, мы провели редактирование с использованием донорных конструкций и репарации на основе гомологичной рекомбинации и показали, что применение донорных конструкций при использовании Un1Cas12f1 позволяет вносить целевые последовательности и селективные кассеты в редактируемые локусы. В настоящее время мы продолжаем работы по оценке активности и методов доставки изучаемой миниатюрной нуклеазы в клетки млекопитающих.

Шерман Д.К.^{1,2} ✉, Богомякова М.Е.¹, Емец Е.В.¹, Богомазова А.Н.¹, Лагарькова М.А.¹

Рецептор NKG2D играет ключевую роль в НК-клеточном ответе на фибробластоподобные производные ИПСК

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М. Лопухина, ФМБА, Москва, Россия

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

✉ dar.sher.man0@gmail.com

Аннотация. Было показано, что рецептор NKG2D играет ключевую роль в цитотоксической активности НК-клеток против фибробластоподобных производных ИПСК, при этом нокаут гена его главного лиганда MICA не приводит к значительному снижению НК-клеточного ответа.

Ключевые слова: ИПСК; дифференцировка; активирующие лиганды; НК-клетки; иммунный ответ.

Sherman D.K.^{1,2}, Bogomiakova M.E.¹, Emets E.V.¹, Bogomazova A.N.¹, Lagarkova M.A.¹

NKG2D receptor plays a key role in the NK-cell response to fibroblast-like iPSC derivatives

¹ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. Here we report that NKG2D receptor plays a key role in the cytotoxic activity of NK-cells against fibroblast-like iPSC derivatives, while knockout of the gene MICA encoding its main ligand does not lead to a significant decrease in the NK-cell response.

Keywords: iPSCs; differentiation; activating ligands; NK-cells; immune tolerance.

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) и их производные рассматриваются как источник материала для заместительной клеточной терапии. Предполагается, что персонализированная терапия на основе дифференцированных производных ИПСК не вызывает иммунной реакции на трансплантат и, как следствие, не требует иммуносупрессивной терапии. Однако остаются сомнения в толерантности иммунной системы в отношении пациент-специфичных производных ИПСК. Ранее в нашей лаборатории были получены сведения о чувствительности фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) к цитотоксическим свойствам аутологичных НК-клеток [1].

Взаимодействие активирующих и ингибирующих лигандов на поверхности клеток-мишеней определяет характер НК-клеточного ответа. Их дисбаланс приводит к активации НК-клеток и секреции цитотоксических гранул, лизирующих клетку. Ранее было показано, что повышенный НК-клеточный ответ на аутологичные iPS-fibro обусловлен повышенной представленностью активирующих лигандов на поверхности iPS-fibro, таких как MICA (лиганд рецептора NKG2D), PVR и NECTIN2 (лиганды рецептора DNAM-1) [1]. Однако вклад каждого из лигандов в НК-клеточный ответ против iPS-fibro остается неизвестным.

Данная работа посвящена получению iPS-fibro с нокаутом генов активирующих лигандов *NECTIN2*, *PVR*, *MICA* и определению наиболее значимого из них в НК-клеточном ответе. На первом этапе работы ИПСК здорового донора дифференцировали в iPS-fibro через стадию эмбрионидных телец. Полученные клетки трансфицировали плазмидой на основе pX458, содержащей нуклеазу Cas9, gRNA и GFP. Через 7–10 дней после первого раунда сортировки по маркерному белку GFP, получали iPS-fibro с нокаутом гена *NECTIN2*, *PVR* и *MICA* путем сортировки негативной популяции по белку интереса. Иммунный ответ НК-клеток, выделенных из крови здоровых доноров, оценивали по уровню экспрессии маркера дегрануляции — CD107a (LAMP-1).

Применение блокирующих антител против NKG2D значительно снижало иммунный ответ NK-клеток против как аллогенных, так и аутологичных iPS-fibro. Это свидетельствует о том, что именно этот рецептор обладает ключевой ролью в реализации цитотоксической программы против iPS-fibro. В то же время нокаут в iPS-fibro гена *MICA*, кодирующего важнейший лиганд рецептора NKG2D, достоверно не влиял на степень иммунного ответа NK-клеток большинства доноров, что говорит о недостаточности инактивации одного из звеньев для полного выключения сигналинга через NKG2D рецептор.

Блокирование антителами другого рецептора, DNAM-1, не снижало дегрануляцию NK-клеток при со-культивировании с iPS-fibro, что подтверждается отсутствием значимого эффекта при нокауте генов *NECTIN2* и *PVR*, кодирующих его лиганды. Ранее Wang *et al.* [2] показали, что нокаут гена *PVR* в производных ИПСК снижал иммунный ответ, что противоречит нашим данным. Интересно, что нокаут *NECTIN2* ведет к усилению иммунного ответа NK-клеток большинства доноров, что указывает на ингибирующую функцию этого лиганда в данном типе клеток.

Таким образом, в ходе данной работы было показано, что рецептор NKG2D является ключевым в реализации цитотоксической программы NK-клеток против iPS-fibro. При этом нокаут в iPS-fibro гена *MICA*, кодирующего лиганд этого рецептора, не является достаточным для значительного снижения NK-клеточного ответа.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00250.

Список литературы

1. Bogomiakova M.E., Sekretova E.K., Anufrieva K.S., et al. iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors // *Stem Cell Res Ther.* 2023. Vol. 14, N 1. P. 77. doi: 10.1186/s13287-023-03308-5
2. Wang B., Iriguchi S., Waseda M., et al. Generation of hypoinmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells // *Nat Biomed Eng.* 2021. Vol. 5, N 5. P. 429–440. doi: 10.1038/s41551-021-00730-z

Шитова М.С.¹, Жданов Д.Д.², Рябченко А.С.¹, Воротеяк Е.А.^{1,3}, Моргун Е.И.¹ ✉

Культивирование и банкирование клеток линии Трег

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

² Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ lady.morgun2016@yandex.ru

Аннотация. Т регуляторные клетки могут стать основой для разработки высокотехнологичных лекарственных препаратов. Изучен фенотип Трег при длительном культивировании, а также после криохранения.

Ключевые слова: Трег; CD4+CD25+CD127(low/-); высокотехнологичный лекарственный препарат.

Shitova M.S.¹, Zhdanov D.D.², Ryabchenko A.S.¹, Vorotelyak E.A.^{1,3}, Morgun E.I.¹

Cultivation and banking of Treg cells

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

³ M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Abstract. T regulatory cells have the potential to serve as the foundation for the development of high-tech medication. The phenotype of Treg was examined during prolonged cultivation, as well as following cryopreservation.

Keywords: Treg; CD4+CD25+CD127(low/-); high-tech medications.

Т регуляторные клетки (Трег) могут стать основой для разработки высокотехнологичных лекарственных препаратов (ВТЛП) для терапии широкого спектра патологий, например, таких как болезнь Альцгеймера, диабет, а также псориаз [1, 2, 3]. Есть различные подходы к получению и культивированию клеток линии Трег. Так, возможно использование натуральных Трег, выделенных из крови пациента и размноженных *in vitro*. Также возможно выделение из крови пациента тотальной фракции CD4+ Т клеток, индукции в них фенотипа Трег — CD4+CD25+CD127(low/-) — их мультипликация и введение в организм пациента. Сохранение фенотипа Трег при продолжительном культивировании с целью мультипликации, а также возможность банкирования данных клеток путем криохранения с сохранением фенотипа является важным вопросом для создания ВТЛП на их основе.

CD4+ Т клетки были выделены из периферической крови здоровых доноров путем магнитного сортирования. Клетки культивировали в течение 21 суток в среде RPMI с 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки с добавлением TGF- β , IL-2, антител против CD3, а также глутамата и пирувата. После 14 суток культивирования часть клеток была заморожена с добавлением в среду 10% DMSO и хранилась 3 суток при температуре -70°C . Фенотип Трег был верифицирован при помощи проточной цитометрии.

В результате эксперимента показано, что непосредственно после выделения CD4+ Т клеток из периферической крови количество клеток фенотипа CD4+CD25+CD127(low/-) составило 6,5%, через 7 суток культивирования — 92,3%, через 14 суток культивирования — 91%, через 21 сутки культивирования — 65%. В то же время после выведения из замораживания и культивирования на протяжении 2 суток количество клеток фенотипа CD4+CD25+CD127(low/-) составило 81%.

Таким образом, оптимальным периодом для мультипликации CD4+CD25+CD127(low/-) Трег является 7–14 суток с возможностью дальнейшего замораживания клеток. Перспективами исследования является изучение функциональной активности Трег после замораживания при различных сроках хранения.

Работа выполняется в рамках Государственного задания ИБР РАН (№ 0088-2024-0013) и Соглашения с Министерством образования и науки РФ № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

Список литературы

1. Mukhatayev Z., Ostapchuk Y.O., Fang D., et al. Engineered antigen-specific regulatory t cells for autoimmune skin conditions // *Autoimmun Rev.* 2021. Vol. 20, N 3. doi: 10.1016/j.autrev.2021.102761
2. Yang H., Park S.Y., Baek H., et al. Adoptive therapy with amyloid- β specific regulatory t cells alleviates alzheimer's disease // *Theranostics.* 2022. Vol. 12, N 18. P. 7668–7680. doi: 10.7150/thno.75965
3. Marek-Trzonkowska N., Myśliwiec M., Iwaszkiewicz-Grześ D., et al. Factors affecting long-term efficacy of t regulatory cell-based therapy in type 1 diabetes // *J Transl Med.* 2016. Vol. 14, N 1. P. 332. doi: 10.1186/s12967-016-1090-7

Шишмаков М.А.^{1,2} ✉, Воловиков Е.А.³, Богомазова А.Н.³, Красильникова И.А.¹,
Бонарцев А.П.², Савостьянов К.В.¹, Бакаева З.В.^{1,4}

Клеточная модель спинальной мышечной атрофии на основе моторных нейронов, полученных путём нейрональной дифференцировки человеческих индуцированных плюрипотентных стволовых клеток

¹ НМИЦ здоровья детей, Москва, Россия

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

³ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина, Москва, Россия

⁴ Первый МГМУ имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

✉ mikhail.shishmakov@yandex.ru

Аннотация. Спинальная мышечная атрофия — нервно-мышечное заболевание, вызванное мутацией в гене SMN1 и приводящее к гибели спинальных мотонейронов. Для изучения молекулярных механизмов патогенеза СМА и тестирования терапевтических препаратов важно создание клеточных моделей, одна из которых была создана нами.

Ключевые слова: клеточная модель; спинальная мышечная атрофия (СМА); нейродегенеративные заболевания; нервно-мышечные заболевания; индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); мотонейроны; дифференцировка; малые молекулы.

Shishmakov M.A.^{1,2}, Volovikov E.A.³, Bogomazova A.N.³, Krasilnikova I.A.¹, Bonartsev A.P.²,
Savostyanov K.V.¹, Bakayeva Z.V.^{1,4}

Cell model of spinal muscular atrophy based on motor neurons derived by neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells

¹ National Medical Research Center for Children's Health, Moscow, Russia

² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

⁴ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. Spinal muscular atrophy is a neuromuscular disease caused by a mutation in the SMN1 gene and leading to the death of spinal motoneurons. It is important to create cell models to study the molecular mechanisms of SMA and for testing therapeutic drugs and one of these models has been created by us.

Keywords: cell model; spinal muscular atrophy (SMA); neurodegenerative diseases; neuromuscular disease; induced pluripotent stem cells (iPSCs); motoneurons; differentiation; small molecules.

Спинальная мышечная атрофия (СМА) — аутомно-рецессивное нервно-мышечное заболевание, вызванное мутацией в гене SMN1 (survival of motor neuron-1), локализованном на длинном плече 5-й хромосомы, и являющееся причиной гибели α -мотонейронов передних рогов спинного мозга и последующей атрофии проксимальных мышц. Ген SMN1 кодирует белок SMN, участвующий в сборке сплайсосом и биогенезе рибонуклеопротеидов. Основной причиной СМА является недостаточная выработка SMN-белка, присутствующего во всех клетках организма. Известно, что пониженный уровень белка SMN оказывает негативное влияние на клеточные процессы в мотонейронах и приводит к их гибели, препятствуя передаче сигналов

между спинным мозгом и скелетными мышцами. Важно отметить, что производить рабочий SMN-белок способны как ген SMN1, так и SMN2 (на 99% идентичный SMN1). Главным различием между этими двумя генами является замена цитозина на тимин в экзоне 7, что приводит к исключению экзона 7 из большинства (~90%) мРНК, транскрибируемых с SMN2-гена, поэтому полученный белок крайне нестабилен. Тем не менее некоторые мРНК SMN2 всё-таки способны продуцировать полноразмерные функциональные белки SMN. Многочисленные исследования продемонстрировали обратную зависимость между количеством копий SMN2 и степенью тяжести заболевания [1]. Существуют препараты, Nusinersen (Спинраза) и Risdiplam (Эврисди), которые увеличивают производство белка SMN из «резервного» гена SMN2 и, таким образом, влияют на течение болезни и её исход. Настоящий прорыв в фармакотерапии связан с появлением Onasemnogene ABERAVOVEC (Золгенсма), генотерапевтического препарата, направленного на замену дефектного гена SMN1. Его преимущество перед аналогами заключается в том, что для лечения СМА ребенку достаточно сделать всего один укол до наступления первых симптомов. Однако у некоторых пациентов клиническая картина заболевания сохраняется и после укола генотерапевтического препарата. Для тестирования эффективности и безопасности таких препаратов, а также для поиска и изучения альтернативных терапевтических целей необходимы клеточные модели СМА, наиболее подходящими из которых являются культуры спинальных мотонейронов, полученные из ИПСК от больных СМА пациентов. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки эквивалентны эмбриональным стволовым клеткам и способны дифференцироваться в клетки-производные всех трёх зародышевых листков организма. ИПСК обеспечивают клинически значимый, этический и масштабируемый источник клеток для моделирования нейродегенеративных заболеваний, в том числе СМА, так как позволяют неинвазивным способом получить культуру нейронов, генетически идентичных нервным клеткам больного пациента [2].

В настоящей работе мы использовали 2 пациент-специфичные линии ИПСК с мутацией в гене SMN1 от больных СМА типа I (iSMA37 и iSMA40) и типа II (m3SMA20), а также линию ИПСК от здорового донора и дифференцировали их в нейрональном направлении [3]. Для начала дифференцировки брали ИПСК 90–100% конфлюэнтности. Культивировали 10 дней в среде, содержащей DMEM/F12:Neurobasal (1:1), B27, N₂, 0,1 мМ L-аскорбиновой кислоты, глутамин, пенициллин/стрептомицин, малые молекулы: 3 мкМ CHIR99021, 2 мкМ Dorsomorphin, 2 мкМ SB431542. Получили нейроэпителиальные предшественники (NEPs). На втором этапе пересаживали NEPs при достижении конфлюэнтности 100% и далее в течение недели культивировали их в вышеописанной среде, содержащей также ретиноевую кислоту RA (0,1 мкМ) и purmorphamine (0,5 мкМ) для получения предшественников мотонейронов (MNP). Иммуноцитохимический анализ экспрессии маркера OLIG выявил 98% клеток, экспрессирующих данный ген. На третьем этапе в течение 10 дней культивировали MNPs в той же среде, дополнительно содержащей 0,5 мМ вальпроевой кислоты. Позже пересевали на планшет AggreWell 400 для формирования сфероидов, через 24 часа вымывали сфероиды и помещали в лунки планшета Ultra-Low Adhesion, в которых культивировали сфероиды в течение 6 дней, после чего диссоциировали на 2D-культуру (95% клеток были ISL+) и выращивали мотонейроны в течение 2 недель в среде, содержащей DMEM/F12:Neurobasal (1:1), B27, N₂, глутамин, пенициллин/стрептомицин, 0,5 мкМ RA, 0,1 мкМ purmorphamine, 0,1 мкМ DAPT [4]. Получили зрелые мотонейроны (95% ChAT+), которые отвечали увеличением внутриклеточной концентрации кальция и падением митохондриального потенциала в ответ на воздействие глутаматом (300 мкМ), причём результаты у здоровых и больных мотонейронов существенно различались.

Таким образом, нам удалось создать полноценную клеточную модель СМА из человеческих спинальных моторных нейронов путём дифференцировки пациент-специфичных ИПСК. Полученные спинальные мотонейроны проявляют нейрональную активность (экспрессируют рецепторы к глутамату) и обладают соответствующим фенотипом (ChAT+). Мы предполагаем, что данная клеточная модель СМА-мотонейронов будет перспективной для поиска и тестирования новых терапевтических препаратов.

Список литературы

1. Wirth B., Karakaya M., Jeong Kye M., et al. Twenty-five years of spinal muscular atrophy research: from phenotype to genotype to therapy, and what comes next // *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2020. Vol. 21. P. 231–261. doi: 10.1146/annurev-genom-102319-103602

2. Welby E., Ebert A. Induced pluripotent stem cells for modeling of spinal muscular atrophy. In: Birbrair A., editor. iPSCs for modeling central nervous system disorders. Academic Press, 2021. P. 147–170. doi: 10.1016/B978-0-323-85764-2.00010-7
3. Valetdinova K.R., Maretina M.A., Kuranova M.L., et al. Generation of two spinal muscular atrophy (SMA) type I patient-derived induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and two SMA type II patient-derived iPSC lines // Stem Cell Res. 2019. Vol. 34. doi: 10.1016/j.scr.2018.101376
4. Du Z.W., Chen H., Liu H., et al. Generation and expansion of highly pure motor neuron progenitors from human pluripotent stem cells // Nat Commun. 2015. Vol. 6. P. 6626. doi: 10.1038/ncomms7626

Шкап М.О.¹ ✉, Докукин Н.В.¹, Самойлова Е.М.^{1,2}, Снежкина А.В.², Кудряшова О.М.^{1,3},
Дорошенко Ю.С.^{1,3}, Ковальчук А.М.^{1,3}, Баклаушев В.Н.^{1–4}

Транскриптомное профилирование травмы спинного мозга после интраспинальной трансплантации плацентарных МСК

¹ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

³ РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ ФНКЦ специализированных видов медицинской помощи ФМБА России, Москва, Россия

✉ shkap010@mail.ru

Аннотация. В эксперименте на крысах со спинальной травмой методом Bulk RNAseq проводили анализ экспрессии ключевых сигнальных путей после локальной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Показано противовоспалительное, антифибротическое и прорегенеративное влияние МСК на паттерны экспрессии.

Ключевые слова: травма спинного мозга; клеточная терапия; нейрорегенерация; МСК; NGS секвенирование; РНК-секвенирование; клеточное микроокружение травмы спинного мозга.

Shkap M.O.¹, Dokukin N.V.¹, Samoilova E.M.^{1,2}, Snezhkina A.V.², Kudryashova O.M.^{1,3},
Doroshenko Yu.S.^{1,3}, Kovalchuk A.M.^{1,3}, Baklaushev V.P.^{1–4}

Transcriptomic profiling of spinal cord injury following intraspinal placental MSC transplantation

¹ Federal Center for Brain and Neurotechnologies, FMBA of Russia, Moscow, Russia

² V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

⁴ Federal Clinical and Research Center for Specialized Medical Care, FMBA of Russia, Moscow, Russia

Abstract. In an experiment on rats with spinal cord injury, the Bulk RNAseq was used to analyze the expression of key signaling pathways after local transplantation of mesenchymal stem cells (MSCs). Anti-inflammatory, antifibrotic and pro-regenerative effects of MSCs on expression patterns were shown.

Keywords: spinal cord injury; cell therapy; neuroregeneration; MSCs; NGS sequencing; RNA sequencing; cellular microenvironment of spinal cord injury.

Травма спинного мозга (ТСМ) — многокомпонентный патологический процесс, в котором большое значение играют сигнальные пути воспаления, апоптоза, формирования глиомезодермального рубца, активации нейрорегенерации и стимуляции роста поврежденных аксонов. Каждый из перечисленных патогенетических компонентов может быть мишенью для молекулярной и клеточной терапии ТСМ [1]. Анализ транскриптома после ТСМ может обнаружить новые мишени для воздействия, поэтому RNAseq как в формате оценки тотальной РНК (Bulk RNAseq), так и в формате анализа транскриптома отдельных клеток (Single-cell RNAseq) активно исследуется на различных животных моделях. Целью нашего исследования было провести анализ транскриптомного профиля образцов методом Bulk RNAseq в процессе терапии ТСМ с помощью интраспинальной трансплантации аллогенных плацентарных мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Контузионная ТСМ моделировалась на уровне Th10 сегмента спинного мозга с помощью импактора (Precise Impactor, RWD). Тяжесть двигательных нарушений оценивали с помощью шкалы BBB и кинематического анализа на разработанном нами аппаратно-программном комплексе. Для проведения RNAseq

под контролем бинокулярного микроскопа забирали область травмы и участок здорового спинного мозга на 3 сегмента выше области травмы. По данным РНК-секвенирования был реконструирован клеточный состав с помощью алгоритма Cassandra, который показал, что по сравнению с контрольной группой (травма с последующим введением PBS) после травмы с трансплантацией МСК наблюдается значимое снижение профиля экспрессии иммунных клеток, таких как цитотоксические CD8 Т-лимфоциты, M2 макрофаги и др. Также наблюдалось снижение фибробластов при добавлении МСК в сравнении с контрольными экспериментами, что потенциально может говорить о способности МСК к уменьшению рубца на месте травмы. Оценка выраженности нейрональных клеточных программ показала, что после трансплантации МСК наблюдается повышение уровня экспрессии пронеурональных генов, что потенциально может способствовать активации нейрорегенерации. Вместе с тем на исследуемых относительно ранних сроках после травмы мы не обнаружили достоверного по сравнению с контролем восстановления локомоторной функции, это говорит о том, что технология противовоспалительной, антифибротической и нейрорегенеративной терапии нуждается в дальнейшем усовершенствовании. Обсуждаются потенциальные молекулярные мишени и новые подходы для оптимизации регенеративной терапии ТСМ.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФМБА России.

Список литературы

1. de Almeida F.M., Marques S.A., Dos Santos A.C.R., et al. Molecular approaches for spinal cord injury treatment // *Neural Regen Res.* 2023. Vol. 18, N 1. P. 23–30. doi: 10.4103/1673-5374.344830

Шнайдер Т.А.¹ ✉, Юнусова А.М.¹, Яковлева С.А.², Чвилёва А.С.², Белокопытова П.С.^{1,2},
Хабарова А.А.¹, Рыжкова А.С.¹, Серов О.Л.^{1–3}, Пристязжнюк И.Е.¹, Смирнов А.В.^{1,2}

Исследование молекулярных и клеточных механизмов нарушений развития головного мозга человека, вызванных мутациями в гене *CNTN6*, на модели церебральных органоидов

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ НИИ медицинской генетики Томского НИМЦ, Томск, Россия

✉ shnyder.t@yandex.ru

Аннотация. Патологии развития головного мозга, связанные с вариациями числа копий генов, остаются малоизученными. Один из таких генов, *CNTN6*, оказался важен для нейрогенеза, влияя на клеточную судьбу и пролиферацию радиальной глии. Он также участвует в транслокации *PAX6* и работает через сигнальный путь Notch на ранних стадиях развития мозга человека.

Ключевые слова: церебральные органоиды; CNV; *CNTN6*; развитие головного мозга; нейрогенез; ИПСК.

Shnaider T.A.¹, Yunusova A.M.¹, Yakovleva S.A.², Chvileva A.S.², Belokopytova P.S.^{1,2}, Khabarova A.A.¹,
Ryzhkova A.S.¹, Serov O.L.^{1–3}, Pristiyazhnyuk I.E.¹, Smirnov A.V.^{1,2}

Investigation of cellular and molecular mechanism of human brain developmentm disruption caused by the *CNTN6* gene mutations using cerebral organoid model

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia

Abstract. Pathologies of brain development associated with copy number variations of genes remain poorly understood. One such gene, *CNTN6*, has been found to be important for neurogenesis, influencing cell fate and the proliferation of radial glia. It also participates in the translocation of *PAX6* and operates through the Notch signaling pathway during the early stages of human brain development.

Keywords: cerebral organoids; CNV; *CNTN6*; brain development; neurogenesis; iPSC.

Патологии развития головного мозга представляют собой разнообразную группу заболеваний со значительным генетическим вкладом, включая патологии, возникающие из-за вариаций числа копий (CNV). Недавние достижения в диагностических методах привели к идентификации новых генов, связанных с патологиями развития головного мозга через CNV. Однако молекулярные и клеточные механизмы этих патологий остаются малоизученными. Одним из таких генов является *CNTN6*. CNV в этом локусе приводят к умственной отсталости и расстройствам аутистического спектра [1, 2]. К сожалению, из-за значительных видоспецифических различий исследования на модельных организмах не дали существенного понимания клеточных и молекулярных механизмов этой патологии. Поэтому роль гена *CNTN6* в нейрогенезе человека остается неизвестной. Используя современные подходы в моделировании патологий развития мозга, в частности перепрограммирование генома [3] и технологию церебральных органоидов [4], мы определили, что ген

CNTN6 участвует в определении клеточной судьбы, люменизации и пролиферации клеток радиальной глии. Кроме того, мы обнаружили, что *CNTN6* играет роль в ядерно-цитоплазматической транслокации белка PAX6, критического регулятора развития кортекса. Детальное исследование молекулярных механизмов показало, что *CNTN6* функционирует через сигнальный путь Notch на ранних стадиях нейрогенеза человека. Таким образом, наши результаты свидетельствуют о совершенно новой и ранее не описанной функции гена *CNTN6* на ранних стадиях развития головного мозга человека. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 19-29-04067) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1063).

Список литературы

1. Kashevarova A., Nazarenko L.P., Schultz-Pedersen S., et al. Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability // *Mol Cytogenet.* 2014. Vol. 7, N 1. P. 97. doi: 10.1186/s13039-014-0097-0
2. Hu J., Liao J., Sathanoori M., et al. CNTN6 copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders // *J Neurodev Disord.* 2015. Vol. 7, N 1. P. 26 doi: 10.1186/s11689-015-9122-9
3. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // *Cell.* 2007. Vol. 131, N 5. P. 861–872. doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019
4. Lancaster M.A., Renner M., Martin C.A., et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly // *Nature.* 2013. Vol. 501, N. 7467. P. 373–379. doi: 10.1038/nature12517

Штам Т.А.¹⁻³ ✉, Емельянова С.С.¹, Гараева Л.А.¹, Соломина Л.А.^{1,4}, Путевич Е.Д.^{1,4},
Спицына А.С.¹, Коневета А.Л.^{1,2,4}

Растительные экстраклеточные везикулы из сока съедобных растений и микроводорослей для регенерации кожи за счет активации гиалуронансинтаз и эластина

¹ НИЦ «Курчатовский институт»-ПИЯФ, Гатчина, Россия

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

³ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁴ ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

✉ shtam_ta@pnpi.nrcki.ru

Аннотация. Проведено исследование продукта, содержащего растительные экстраклеточные везикулы (РЭВ) из сока съедобных растений или культуральной среды микроводорослей для регенерации кожи. Регенеративное действие РЭВ на интактную кожу и заживление ран основано на их влиянии на экспрессию генов эластина и гиалуронансинтаз.

Ключевые слова: растительные экстраклеточные везикулы; регенерация кожи; гиалуронансинтазы; эластин.

Shtam T.A.¹⁻³, Emelianova S.S.¹, Garaeva L.A.¹, Solomina L.A.^{1,4}, Putevich E.D.^{1,4},
Spitsyna A.S.¹, Konevega A.L.^{1,2,4}

Plant extracellular vesicles from edible plant juice and microalgae for skin regeneration by activating hyaluronic acid synthases and elastin

¹ Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russia

² Institute of Cytology of Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia

³ National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia

⁴ Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia

Abstract. A study was conducted on a product containing plant extracellular vesicles (PEV) from the juice of edible plants or the culture medium of microalgae for skin regeneration. The regenerative effect of PEV on intact skin and wound healing is based on their effect on the expression of elastin and hyaluronan synthases genes.

Keywords: plant extracellular vesicles; skin regeneration; hyaluronan synthases; elastin.

Сегодня существует огромное количество косметических средств и процедур с гиалуроновой кислотой (ГК), которые направлены на улучшение состояния кожи и омоложение. Однако попытки восстановить нормальный уровень увлажнения кожи исключительно с помощью наружных средств не всегда бывают успешными, так как проблема заключается именно в недостатке ГК в глубоких слоях кожи. Высокомолекулярная ГК в силу своей величины и разветвленности молекулы не способна проникать вглубь при наружном применении [1]. Вместо поиска способов доставки экзогенной высокомолекулярной ГК в глубокие слои кожи, более рациональным подходом является активация её синтеза непосредственно в клетках. Важнейшим способом регуляции синтеза ГК является изменение экспрессии ферментов, ГК синтаз. Использование экзосом и других видов экстраклеточных везикул (ЭВ) является одним из перспективных подходов в косметологии, а также терапевтическим методом заживления ран [2]. Исследования терапевтического потенциала растительных экстраклеточных везикул (РЭВ) при лечении различных повреждений кожи

и улучшения ее состояния активно ведутся, и уже сейчас есть данные, подтверждающие перспективность их применения [3]. Целью данной работы стала оценка влияния РЭВ на регенерацию клеток кожи человека после их механического повреждения, а также разработка продукта с РЭВ для регенерации и улучшения состояния кожи путем активации синтеза ГК и эластина.

РЭВ были выделены методом последовательного дифференциального ультрацентрифугирования из культуральной среды микроводорослей, а также из плодов томата и огурца. Клетки линий HaCat (кератиноциты), DF-2 (фибробласты), HEK293T (клетки эмбриональной почки человека) в монослое повреждали и сокультивировали с РЭВ. Анализ влияния РЭВ на пролиферативную активность неповрежденных клеток (цитотоксичность) проводили с использованием RTCA xCELLigence. Жизнеспособность клеток, подверженных механическому повреждению, оценивали с помощью резазурин-теста. С целью оценки влияния на время заживления и формирование рубца в ходе применения продукта, содержащего РЭВ, использовали модель резанной раны на лабораторных животных. Экспрессию генов, белковые производные которых участвуют в заживлении раны: гиалуранансинтаза 1-го и 2-го типа (*HAS1*, *HAS2*), а также эластина (*ELN*) оценивали методом ОТ-ПЦР.

Продукт, содержащий РЭВ из всех продуцентов, не вызывает токсического действия и не приводит к бесконтрольной пролиферации клеток кератиноцитов и фибробластов человека линий HaCat и DF-2, а также клеток не кожной этиологии HEK293T. РЭВ повышали выживаемость и пролиферацию (относительно поврежденного контроля) дермальных фибробластов человека линии DF-2 после механического повреждения, восстанавливая жизнеспособность до уровня неповрежденных клеток. При соинкубировании клеток HaCat с РЭВ наблюдалось значимое увеличение жизнеспособности кератиноцитов линии HaCat. Таким образом, продукт, содержащий РЭВ, увеличивает жизнеспособность и пролиферативную активность клеток линии кожных фибробластов человека и кератиноцитов человека после механического повреждения. В экспериментах на животных моделях применение препарата, содержащего РЭВ в качестве активного компонента, способствует увеличению скорости и эффективности заживления раны, а также снижению выраженности шрамowego рубца после повреждения.

РЭВ из исследованных растительных источников в поврежденных клетках линии DF-2 активирует экспрессию гена гиалуранансинтазы 1-го типа в 4–800 раз, гиалуранансинтазы 2-го типа в 1,8–5 раз и экспрессию гена эластина 1,9–2 раза относительно значения в контрольных клетках, что может приводить к увеличению синтеза и накоплению активных компонентов внеклеточного матрикса дермы — высокомолекулярной ГК и эластина. РЭВ в поврежденных клетках линии HaCat активирует экспрессию гена гиалуранансинтазы 2-го типа в 1,1–3,2 раза относительно значения в контрольных клетках.

На основе результатов работы можно заключить, что РЭВ из исследованных источников не оказывают цитотоксического и онкогенного действия, увеличивают экспрессию целевых генов в клетках кожи человека после их механического повреждения и повышают их жизнеспособность. В совокупности, РЭВ рассмотренных в данной работе продуцентов потенциально могут оказывать терапевтическое действие при заживлении раны.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт»–ПИЯФ.

Список литературы

1. Essendoubi M., Gobinet C., Reynaud R., et al. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy // *Skin Res Technol*. 2016. Vol. 22, N 1. P. 55–62. doi: 10.1111/srt.12228
2. Prasai A., Jay J.W., Jupiter D., et al. Role of exosomes in dermal wound healing: a systematic review // *J Invest Dermatol*. 2022. Vol. 142, N 3. P. 662–678. doi: 10.1016/j.jid.2021.07.167
3. Savcı Y., Kirbaş O.K., Bozkurt B.T., et al. Grapefruit-derived extracellular vesicles as a promising cell-free therapeutic tool for wound healing // *Food Function*. 2021. Vol. 12, N 11. P. 5144–5156. doi: 10.1039/d0fo02953j

Шульгина А.Е. ✉, Сорогина Д.А., Погосова М.А., Павлова С.В., Дементьева Е.В., Закиян С.М.

Создание клеточной модели гипертрофической кардиомиопатии на основе кардиомиоцитов, полученных из ИПСК с патогенным вариантом c.966G>A в гене *MYBPC3*

Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

✉ ange.shulgina@yandex.ru

Аннотация. Получена клеточная модель на основе кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК пациента, страдающего гипертрофической кардиомиопатией, ассоциированной с патогенным вариантом c.966G>A в гене *MYBPC3*, для изучения влияния активации рецепторов PPAR на проявление признаков кардиомиопатии *in vitro*.

Ключевые слова: гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП); индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК); кардиальная дифференцировка; кардиомиоцит; рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPARs).

Shulgina A.E., Sorogina D.A., Pogosova M.A., Pavlova S.V., Dementieva E.V., Zakiyan S.M.

Creation of a cellular model of hypertrophic cardiomyopathy based on cardiomyocytes obtained from iPSCs with the pathogenic variant c.966G>A in the *MYBPC3* gene

Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. A cellular model based on cardiomyocytes differentiated from iPSCs of a patient suffering from hypertrophic cardiomyopathy associated with the pathogenic variant c.966G>A in the *MYBPC3* gene was obtained to study the effect of activation of PPAR receptors on the manifestation of signs of cardiomyopathy *in vitro*.

Keywords: hypertrophic cardiomyopathy (HCM); induced pluripotent stem cells (iPSCs); cardiac differentiation; cardiomyocyte; receptors activated by peroxisomal proliferators (PPARs).

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 диастолической дисфункции. На сегодняшний день известно более 1400 генетических вариантов, связанных с ГКМП, в генах, которые по большей части кодируют саркомерные белки [1]. В лаборатории НМИЦ Кардиологии у пациента, страдающего ГКМП, в результате анализа клинического экзостама был выявлен генетический вариант c.966G>A (p.W322*) в кодирующей области 12 экзона гена *MYBPC3*. Замена гуанина на аденин изменяет аминокислоту с триптофана на стоп-кодон, что, как предполагается, приводит к потере функции из-за преждевременного усечения белка или нонсенс-опосредованного распада мРНК. Он также указан на cardiodb.org как присутствующий в когорте OMGL/LMM HCM, классифицированный как патогенный. В ClinVar данный вариант имеет статус патогенный (rs7275032110). При ГКМП происходит накопление кальция в саркомерах, что приводит к его дефициту в митохондриях, что в свою очередь индуцирует переход от окислительного фосфорилирования к гликолизу [2]. Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPARs), в частности PPAR α и PPAR δ , вносят значительный вклад в регуляцию

энергетического метаболизма кардиомиоцитов [3]. Мы предположили, что активация рецепторов PPAR α и PPAR δ может способствовать коррекции метаболических и других нарушений в кардиомиоцитах при гипертрофической кардиомиопатии *in vitro*. Активированные рецепторы PPAR являются транскрипционными факторами и запускают регуляторные сети генов, лежащие в основе FAO, увеличивают содержание митохондрий и пероксисом, усиливают образование митохондриальных крист и увеличивают поток FAO, а также дополнительно увеличивают бинуклеацию, улучшают организацию миофибрилл, улучшают сократимость и в сочетании с лактатом усиливают окислительный метаболизм [4]. Для того, чтобы проверить это предположение, мы должны были получить клеточную модель на основе кардиомиоцитов с патогенным генетическим вариантом гена, ассоциированным с ГКМП. Мы перепрограммировали к плюрипотентному состоянию мононуклеары пациента, страдающего ГКМП, ассоциированной с патогенным вариантом с.966G>A (p.W322*) гена *MYBPC3*, посредством трансфекции эписомными векторами, кодирующими OCT4, KLF4, L-MYC, SOX2, LIN28 и trp53DD. Полученные линии ИПСК HC10-31 (ICGi047-A) стандартными методами были проверены на экспрессию маркеров плюрипотентного состояния, способность спонтанно дифференцироваться в производные трех зародышевых листков *in vitro* и сохранение нормального кариотипа, и таким образом было подтверждено сохранение плюрипотентных свойств и зарегистрирована в европейском банке IPSreg под номером ICG047-A. Далее мы провели направленную дифференцировку линии пациент-специфичных ИПСК GC10-31 (ICGi047-A) и линий ИПСК здоровых доноров K7-4Lf (ICGi022-A) и K6-4f (ICGi021-A) в кардиомиоциты согласно протоколу, основанному на модуляции сигнального пути Wnt [5]. Поскольку вариант с.966G>A в гене *MYBPC3* по данным базы ClinVar является патогенным, мы исследовали его проявление на клеточной культуре посредством таких признаков, как размер кардиомиоцитов, экспрессия регуляторных генов и метаболизм. В ходе анализа размеров кардиомиоцитов было показано, что площади кардиомиоцитов из пациент-специфичных ИПСК достоверно увеличены по сравнению с площадями кардиомиоцитов контрольных линий. Данные по экспрессии генов в кардиомиоцитах, полученных из пациент-специфичных ИПСК с вариантом с.966G>A в гене *MYBPC3* и линии ИПСК от здорового донора, выявили повышенную регуляцию натрийуретического пептида А (NPPA), которая, как было показано, является одним из признаков гипертрофии в многочисленных исследованиях моделей ГКМП на основе ИПСК и транскриптомов тканей сердца пациентов с ГКМП. Уровень экспрессии двух медиаторов гипертрофии, GATA4 и MEF2C, был одинаковым в обоих типах кардиомиоцитов. Гипертрофия кардиомиоцитов также была подтверждена повышенной экспрессией уровня двух генов саркомеров (MYL2, TNNT2), которые часто повышались в моделях HCM на основе ИПСК. Различий в экспрессии генов, участвующих в регуляции кальциевого гомеостаза (RYR2, ATP2A2, PLN), между кардиомиоцитами обоих типов не наблюдалось. Предварительные результаты анализа митохондриального дыхания с помощью технологии Seahorse показали, что в кардиомиоцитах из пациент-специфичных ИПСК базовый показатель OCR был значительно ниже, чем в кардиомиоцитах здорового донора. Мы также провели анализ экспрессии генов PPAR α , PPAR γ и PPAR δ в кардиомиоцитах из пациент-специфичных ИПСК и ИПСК здорового донора и не обнаружили достоверных различий. Полученные кардиомиоциты в дальнейшем будут использованы для определения влияния агонистов PPAR на энергетический обмен.

Работа выполнена при поддержке Фонда научно-технологического развития Югры № 2023-566-05.

Список литературы

1. Ватулин Н.Т., Тарадин Г.Г., Марон М.С. Гипертрофическая кардиомиопатия: генетические изменения, патогенез и патофизиология // Российский кардиологический журнал. 2014. № 5. С. 35–42. doi: 10.15829/1560-4071-2014-5-35-42
2. Ramachandra C.J.A., Mai Ja K.P.M., Lin Y.H., et al. Induced pluripotent stem cells for modeling energetic alterations in hypertrophic cardiomyopathy // Cond Med. 2019. Vol. 2, N 4. P. 142–151.
3. Nadeera N.M., Sachs D., Shewale B., et al. PPAR δ activation induces metabolic and contractile maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes // Cell Stem Cell. 2022. Vol. 29, N 4. P. 559–576. doi: 10.1016/j.stem.2022.02.011
4. Kalliora S., Kyriazis I.D., Oka S.I., et al. Dual PPAR α /g activation inhibits SIRT1-PGC1 α axis and causes cardiac dysfunction // JCI Insight 2019. Vol. 5, N 17 doi: 10.1172/jci.insight.129556
5. Burridge P.W., Matsa E., Shukla P., et al. Chemically defined generation of human cardiomyocytes // Nat Methods. 2014. Vol. 11, N 6. P. 855–860. doi: 10.1038/nmeth.2999

Шурыгина И.А. ✉, Шурыгин М.Г., Аюшинова Н.И., Чепурных Е.Е.

Применение блокаторов MAP киназ для регулирования роста соединительной ткани при полостных операциях

ФГБНУ Иркутский научный центр хирургии и травматологии, Иркутск, Россия

✉ irinashurygina@gmail.com

Аннотация. В статье представлены основные результаты, полученные в Иркутском научном центре хирургии и травматологии в рамках работ по управлению ростом соединительной ткани, в частности для профилактики развития спаечного процесса в брюшной полости после хирургических операций. Показано участие p38 MAPK в этом процессе, двухволновый характер активации MAPK при травме брюшины. Разработано средство для профилактики спаечного процесса в брюшной полости.

Ключевые слова: соединительная ткань; митогенактивируемые протеинкиназы; спаечная болезнь.

Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., Chepurnykh E.E.

Use of map kinase blockers to regulate connective tissue growth in abdominal surgery

Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

Abstract. The article presents the main results obtained at the Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology as part of work on controlling the growth of connective tissue, in particular to prevent the development of adhesions in the abdominal cavity after surgery. The participation of p38 MAPK in this process and the two-wave nature of MAPK activation during peritoneal trauma have been shown. The drug has been developed to prevent the formation of adhesions in the abdominal cavity.

Keywords: connective tissue; MAPK; adhesive disease.

Соединительная ткань — это ткань живого организма, не отвечающая непосредственно за работу какого-либо органа или системы органов, но играющая формообразующую и вспомогательную роль во всех органах, составляя 60–90% от их массы. Выполняет структурообразующую, защитную и трофическую функции.

В ИНЦХТ реализуется проект поиска принципиально новых подходов к лечению группы заболеваний, характеризующихся повышенным развитием соединительной ткани [1]. Одной из актуальных проблем в хирургии, связанной с бесконтрольным формированием соединительной ткани, является проблема образования спаек [2]. Нами разработана модель спаечного процесса в брюшной полости, приближенная к клинической практике [3]. На данной модели показано, что развитие данной патологии регулируется с участием каскадов митогенактивируемых протеинкиназ (MAPK). Так, в условиях асептического повреждения брюшины активация экспрессии белков p38 каскада отмечалась с первых 6 часов до 30 суток с максимумом на 14-е сутки, а для активных фосфорилированных форм киназ p38 пик регистрировался на 3-и сутки.

Впервые были получены данные, свидетельствующие о двухволновом процессе активации спайкообразования, причем вторая волна вследствие большого временного промежутка от момента инициации спайкообразования (14-е сутки) в доступной литературе не описана и ранее не учитывалась при разработке средств для профилактики данного осложнения полостной хирургии.

Удалось определить возможные мишени для угнетения спайкообразования, которыми стали белки каскада p38 MAPK [4], и очертить требования, которым должно отвечать кандидатное лекарственное средство для успешного подавления спайкообразования при минимизации побочных эффектов. В результате

реализации программы исследований появилось инновационное лекарственное средство СЕРОГАРД® [5], являющееся заявкой на референсный препарат для профилактики спаек, с очень высокой эффективностью по результатам доклинических и клинических исследований. В 2024 году была успешно завершена III фаза клинических исследований «Перспективное многоцентровое рандомизированное двойное слепое сравнительное плацебо-контролируемое клиническое исследование эффективности и безопасности препарата Серогард, раствор для внутрисполостного введения (АО «Фармасинтез», Россия), при применении для профилактики образования спаек у пациентов после оперативных вмешательств».

Список литературы

1. Shurygina I.A., Shurygin M.G., Ayushinova N.I., et al. Mechanisms of connective tissue formation and blocks of mitogen activated protein kinase // *Front Chem Sci Eng*. 2012. Vol. 6. P. 232–237. doi: 10.1007/s11705-012-1286-1
2. Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., и др. Госпитальная эпидемиология спаечной болезни брюшной полости // *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2016. Т. 1, № 4(110). С. 115–118. EDN: WKNRUH
3. Аюшинова Н.И., Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., и др. Экспериментальная модель для разработки способов профилактики спаечного процесса в брюшной полости // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. 2012. Т. 109, № 2. С. 51–53. EDN: OXUMMD
4. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г., Зеленин Н.В., и др. Воздействие на митогенактивируемые протеинкиназы как новое направление регуляции роста соединительной ткани // *Бюллетень сибирской медицины*. 2017. Т. 16, № 4. С. 86–93. EDN: YQMYBF doi: 10.20538/1682-0363-2017-4-86-93
5. Shurygin M.G., Shurygina I.A., inventors. Compounds, pharmaceutical compositions and a method for the prophylaxis and treatment of the adhesion process. Patent WO 2012156938. 2012 Nov 22.

Шурыгина И.А. ✉, Шурыгин М.Г.

Активность NADH цитохром b5 редуктазы 3 при регенерации мышечной ткани

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия

✉ irinashurygina@gmail.com

Аннотация. Изучена экспрессия цитохром b5 редуктазы 3 при регенерации мышечной ткани в зоне травматического повреждения. Отмечено, что выраженная экспрессия наблюдается в зоне повреждения с 3 по 35 сутки с максимумом с 9 по 21 сутки, что совпадает с периодом максимальной пролиферации миосателлитов в зоне травмы.

Ключевые слова: регенерация; мышечная ткань; миосателлиты; цитохром b5 редуктаза 3.

Shurygina I.A., Shurygin M.G.

Activity of NADH cytochrome B5 reductase 3 during muscle tissue regeneration

Irkutsk Scientific Center of Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

Abstract. The expression of cytochrome b5 reductase 3 during the regeneration of muscle tissue in the area of traumatic injury was studied. It was noted that pronounced expression was observed in the damaged area from days 3 to 35 with a maximum from days 9 to 21. This period coincides with the period of maximum proliferation of myosatellites in the injury area.

Keywords: regeneration; muscle tissue; myosatellite cells; cytochrome b5 reductase 3.

Цитохромы — это мембранные белки, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. В митохондриях клеток высших животных и растений идентифицировано пять цитохромов: b, c, c1, a, a3, в эндоплазматическом ретикулуме — b5.

Основное внимание уделяется цитохрому c. Показано снижение окислительного фосфорилирования в зоне ишемического повреждения, при этом под действием фактора роста эндотелия сосудов отмечена резкая активация фосфорилирования в перинфарктной зоне [1]. Зафиксирована активация окислительного фосфорилирования при регенерации мышечной ткани в условиях блокады p38 MAP-киназного каскада [2].

Цитохром b, так же как и цитохром c, участвует в дыхательной цепи, является компонентом респираторной цепи комплекса III, однако ему уделяется гораздо меньше внимания. NADH цитохром b5 редуктаза 3 (CYB5R3) относится к семейству флавопротеинов. Выделяют две изоформы CYB5R3: растворимая цитозольная изоформа (метгемоглобинредуктаза), которая экспрессируется исключительно в эритроидном ростке, и CYB5R3, связанный с мембраной. В скелетных мышцах крупного рогатого скота показана локализация НАДН-цитохром b(5) редуктазы в красных волокнах, преимущественно в митохондриальной фракции, но также была обнаружена в более низких количествах в микросомальной фракции [3]. В доступной литературе обнаружить сведения о вовлечении CYB5R3 в репаративный процесс в мышечной ткани не удалось.

Цель исследования: Оценить вовлеченность NADH цитохром b5 редуктазы 3 в репаративный процесс при повреждении мышечной ткани.

Эксперимент выполнялся в соответствии с нормами гуманного обращения с животными, которые регламентированы «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 № 755) согласно протоколу, одобренному

Комитетом по этике ФГБНУ ИНЦХТ. Крысам-самцам линии Вистар весом 220–250 г, которые содержались при естественном освещении, на стандартном рационе питания и свободном доступе к пище и воде в условиях вивария, в асептических условиях, в условиях операционной под наркозом (кетамин — 50 мг/кг, дроперидол — 0.5 мг/кг, атропин — 0.15 мг/кг) выполняли разрез кожи и подкожной клетчатки, мышцы в паравerteбральной области, осуществляли тщательный гемостаз, накладывали швы на кожу. Всего в экспериментах использовано 30 животных. Выведение животных из эксперимента осуществляли на 3, 5, 9, 14, 21, 35-е сутки. Для исследования забирали фрагмент мышечной ткани из зоны повреждения, для гистологического исследования фиксировали раствором FineFix (Milestone, Италия). Контролем служила интактная мышечная ткань. После фиксации осуществляли проводку и заливку материала в парафиновые блоки, изготавливали серийные срезы толщиной 3 мкм. Исследование проводили методом световой микроскопии с использованием окраски гематоксилин-эозином. При проведении иммуногистохимического исследования [4] в качестве первичных антител использовали антитела к CYB5R3 (Abcam).

В зоне повреждения оценивали интенсивность регенерации мышечной ткани путем определения ядер миосателлитов [5] в поле зрения в зоне повреждения. Отмечено, что посттравматическая регенерация мышц начиналась на 5-е сутки после нанесения повреждения, наблюдалась до конца наблюдения (35-е сутки) с максимальной интенсивностью пролиферации миосателлитоцитов с 9-х по 21-е сутки.

При оценке гистохимической окраски на CYB отмечено, что в интактной мышечной ткани окраска не фиксировалась весь период наблюдения. Напротив, в зоне регенерации на 3-и сутки появлялась минимальная окраска, ее интенсивность нарастала с максимумом с 9-х по 21-е сутки.

Таким образом, нами показана вовлеченность NADH цитохром b5 редуктазы 3 в репаративный процесс при регенерации мышечной ткани.

Список литературы

1. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Каня О.В., и др. Морфологическая оценка системы окислительного фосфорилирования при инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации вазоэндотелиального фактора роста // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 3. С. 386–389. EDN: TMGXQD
2. Шурыгина И.А., Шурыгин М.Г. Влияние p38 MAPK на окислительное фосфорилирование при регенерации мышечной ткани // Патогенез. 2018. Т. 16, № 4. С. 66–70. EDN: EXOQXQ doi: 10.25557/2310-0435.2018.04.66-70
3. Arihara K., Cassens R.G., Greaser M.L., et al. Localization of metmyoglobin-reducing enzyme (NADH-cytochrome b(5) reductase) system components in bovine skeletal muscle // Meat Sci. 1995. Vol. 39, N 2. P. 205–213. doi: 10.1016/0309-1740(94)p1821-c
4. Шурыгин М.Г., Шурыгина И.А., Дремина Н.Н., и др. Экспрессия эндотелина при экспериментальном инфаркте миокарда в условиях измененной концентрации фибробластического и вазоэндотелиального факторов роста // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук. 2013. Т. 89, № 1. С. 125–129. EDN: QAIRTT
5. Шурыгин М.Г., Болбат А.В., Шурыгина И.А. Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани // Фундаментальные исследования. 2015. № 1–8. С. 1741–1746. EDN: TXQNRL

Шурыгина И.А. ✉, Трухан И.С., Дремина Н.Н., Шурыгин М.Г.

Новый флуоресцентный сенсор для визуализации лизосом

ФГБНУ «Иркутский научный центр хирургии и травматологии», Иркутск, Россия

✉ irinashurygina@gmail.com

Аннотация. Протестированы с использованием культур клеток соединения, относящиеся к классу BODIPY. Выбрано наиболее перспективное соединение, которое соответствует требованиям растворимости в нетоксичных растворителях и стабильности при хранении, показывает стабильные результаты при прижизненном окрашивании лизосом. Накапливается избирательно в лизосомах, данное накопление время- и дозозависимое, зависит от активности лизосом в клетке. Данную разработку можно рассматривать как удобный инструмент в прижизненном изучении лизосом.

Ключевые слова: лизосомы; Bodipy; прижизненное окрашивание.

Shurygina I.A., Trukhan I.S., Dremina N.N., Shurygin M.G.

New fluorescent sensor for visualization of lysosomes

Irkutsk Scientific Center for Surgery and Traumatology, Irkutsk, Russia

Abstract. In this work, we tested compounds belonging to the BODIPY class using cell cultures. The most promising compound was selected that meets the requirements of solubility in non-toxic solvents and storage stability. BODIPY has stable results in intravital staining of lysosomes. It accumulates selectively in lysosomes; this accumulation is time- and dose-dependent and depends on the activity of lysosomes in the cell. This development can be considered as a convenient tool in the intravital study of lysosomes.

Keywords: lysosomes; Bodipy; intravital staining.

Лизосомы — одномембранные органеллы округлой формы и размером до 2 мкм, содержащие до 60 различных гидролаз, относящихся к классам нуклеаз, протеаз, фосфатаз, липаз, сульфатаз. Основной функцией лизосом классически считается деградация макромолекул, транспортируемых в клетку, а также внутриклеточных молекул и структур в процессе аутофагии, что особенно важно для дифференцировки и поддержания клеточной активности. Однако исследования последних десяти лет показали, что помимо основной функции лизосомы вовлечены во множество физиологических и патологических процессов, протекающих в живых клетках. Так, лизосомы участвуют в трансдукции сигналов, в регуляции пролиферации, анаболических и катаболических процессов, влияют на активность других клеточных компартментов, вовлечены в иммунный ответ, а также являются триггерами некоторых заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ [1], участвуют в канцерогенезе [2].

Исключительная роль лизосом в метаболизме клеток определяет необходимость их изучения. На сегодняшний день разнообразие коммерческих реактивов, предоставляемых специализированными компаниями для визуализации лизосом в живых клетках, невелико (LysoTracker; CellLight™ Lysosomes-GFP, VacMan 2.0 и др.), кроме того, коммерческие продукты имеют ряд недостатков, таких как длительное время инкубации, ограниченный период флуоресценции (в пределах нескольких десятков минут), быстрое выгорание, варьирование в эффективности, зависящее от типа клеток и вида животного, короткие сроки хранения. В связи с этим по-прежнему актуальным остается поиск соединений, способных специфически прижизненно окрашивать лизосомы, удобных в применении для клеточных культур, хорошо растворимых в растворителях, нетоксичных для живых клеток и при этом достаточно стабильных как внутри клеток в условиях эксперимента, так и при длительном хранении. Нами совместно с сотрудниками Иркутского института

химии им. А.Е. Фаворского получены и протестированы с использованием культур клеток соединения, относящиеся к классу BODIPY (4,4-дифторо-5-фенил-3-(1,5-дифенил-3-1Н-пиразолил)-8-трифторметил-4-бора-3а,4а-диаза-8-индацен [3, 4, 5]. Выбрано наиболее перспективное соединение, которое соответствует требованиям растворимости в нетоксичных растворителях и стабильности при хранении, показывает стабильные результаты при прижизненном окрашивании лизосом. Накапливается избирательно в лизосомах, данное накопление время- и дозозависимое, зависит от активности лизосом в клетке.

Данную разработку можно рассматривать как удобный инструмент в прижизненном изучении лизосом. Работа проведена с использованием оборудования ЦКП «Диагностические изображения в хирургии».

Список литературы

1. Ballabio A., Bonifacino J.S. Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020. Vol. 21, N 2. P. 101–118. doi: 10.1038/s41580-019-0185-4
2. Трухан И.С., Дремина Н.Н., Шурыгина И.А. Роль лизосом в онкогенезе: акцент на деградацию внеклеточного матрикса // *Acta Biomedica Scientifica.* 2020. Т. 5, № 6. С. 77–87. EDN: QVGGCZ doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.9
3. Патент на изобретение РФ № 2717308 / 20.03.2020. Томилин Д.Н., Шурыгина И.А., Трухан И.С., и др. Флуоресцентный сенсор для детектирования лизосом *in vitro*. EDN: VCQULQ
4. Trukhan I.S., Tomilin D.N., Dremina N.N., et al. Application of meso-CF 3-fluorophore bodipy with phenyl and pyrazolyl substituents for lifetime visualization of lysosomes molecules // *Molecules.* 2022. Vol. 27, N 15. P. 5018. doi: 10.3390/molecules27155018
5. Shurygina I.A., Dremina N.N., Trukhan I.S., et al. Meso-CF3-difluoroboradiazaindacenes (bodipy) as markers for visualization of lysosomes // *Russian Journal of General Chemistry.* 2023. Vol. 93, N. S1. P. S173–S179. EDN: SGZIDY doi: 10.1134/S1070363223140414

Эйгель Д.М.¹ ✉, Исаева Е.В.¹, Кисель А.А.¹, Демяшкин Г.А.^{1,2}, Атякшин Д.А.³, Клабуков И.Д.^{1,4,3},
Барановский Д.С.^{1,3}, Шегай П.В.¹, Иванов С.А.¹, Каприн А.Д.^{1,3}

Лазерная гравировка эластического хряща для тканевой инженерии ушных трансплантатов

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Первый Московский государственный медицинский университет имени Сеченова Минздрава России, Москва, Россия

³ Российский университет дружбы народов им. П. Лумумбы, Москва, Россия

⁴ Обнинский институт атомной энергетики НИЯУ МИФИ, Обнинск, Россия

✉ eygdaria@gmail.com

Аннотация. Использование перфорированного децеллюляризованного хряща ушной раковины для регенерации дефектов наружного уха. Использовался новый подход к модификации поверхности трансплантата и эффективности восстановления тканей с помощью инфракрасного лазера и заселения этих каркасов назальными хондроцитами.

Ключевые слова: лазерная гравировка; хрящевая ткань; тканевая инженерия; тканеинженерные конструкции; ушной хрящ; назальные хондроциты; регенеративная медицина.

Eygel D.M.¹, Isaeva E.V.¹, Kisel A.A.¹, Demyashkin G.D.^{1,2}, Atiakshin D.A.³, Klabukov I.D.^{1,4,3},
Baranovskii D.S.^{1,3}, Shegai P.V.¹, Ivanov S.A.¹, Kaprin A.D.^{1,3}

Laser engraving of elastic cartilage for tissue engineering of ear transplants

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

³ Patrice Lumumba Peoples Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

⁴ Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering of the National Research Nuclear University MEPhI, Obninsk, Russia

Abstract. The use of perforated decellularized ear cartilage for the regeneration of outer ear defects. The new approach was implemented to modify the surface of the transplant and enhance tissue regeneration efficacy using an infrared laser and the seeding of these scaffolds with nasal chondrocytes.

Keywords: laser-engraving; cartilage tissue; tissue engineering; tissue engineered constructs; ear cartilage; nasal chondrocytes; regenerative medicine.

Высокая распространенность патологий хрящевой ткани, обладающей ограниченной способностью к регенерации, делает их лечение сложной задачей и вызывает значительный научный интерес в этой области. В последнее время повышенное внимание уделяется методам тканевой инженерии, за счет ее способности создавать функциональные трансплантаты для замены поврежденных или потерянных тканей. Особую роль здесь играют каркасные структуры, полученные из децеллюляризованной ткани, которые сохраняют естественные свойства исходной ткани, а также имеют большую биосовместимость [1]. Однако даже такой вид трансплантатов имеет ряд трудностей, в том числе с эффективностью посева клеток. Представляется перспективным новый подход к лазерной модификации поверхности каркаса и эффективности ревитализации тканей [2, 3].

Цель нашей работы — изучить возможность тканеинженерных трансплантатов на основе перфорированного децеллюляризованного кадаверного хряща ушной раковины кролика, заселенного аллогенными

назальными хондроцитами, восстанавливать дефект наружного уха. Экспериментальные исследования проводили на модели с полнослойными дефектами эластического хряща наружного уха кролика и имплантировали в них тканеинженерные трансплантаты. В этом исследовании был разработан каркас децеллюляризованного внеклеточного матрикса, полученный из хрящевой ткани кроличьего уха. Процесс его создания состоял из нескольких этапов децеллюляризации и лазерной гравировки инфракрасным лазером длиной волны 1064 нм, что позволило создать микролунки на его поверхности. В ходе разработки каркаса были выявлены оптимальные показатели параметров перфорации децеллюляризованного кадаверного хряща, при которых не наблюдаются нежелательные эффекты, но при этом имеется максимальная площадь для контакта для репопуляции и миграции клеток [4]. Трансплантаты были разделены на группы с ревитализацией назальными хондроцитами кролика [5] и без нее. Гистологические образцы в области имплантации каркаса были окрашены сафранином O, а также иммуногистохимически.

В результате было выявлено, что происходит интеграция тканеинженерных конструкций в дефекты хряща. Четкой границы между каркасом и нормальной тканью не было. Кроме того, наблюдался рост новообразованной хрящевой ткани, прилегающей и к клеточным, и к бесклеточным конструкциям.

Выводы: в ходе экспериментов были определены оптимальные параметры лазерной перфорации хряща: радиус лунок 60 мкм, расстояние между центрами 200 мкм, плотность мощности лазера $5,5 \times 10^5$ Вт/см², скорость 0,1 мм/с, и всего 20 проходов. В самом же исследовании было выявлено, что назальные хондроциты, которые уже используются в клинике для восстановления дефектов хряща, эффективно колонизируют поры перфорированных лазером ушных хрящей и производят хрящевые матриксы *in vivo*. Также оно показало, что каркасы с назальными хондроцитами поддерживают стабильную реконструкцию дефектов ушного хряща и рост новообразованной хрящевой ткани.

Список литературы

1. Pina S., Ribeiro V.P., Marques C.F., et al. Scaffolding strategies for tissue engineering and regenerative medicine applications // *Materials*. 2019. Vol. 12, N 11. P. 1824. doi: 10.3390/ma12111824
2. Шах А.С., Исаев Е.И., Барановский Д.С., и др. Использование импульсного лазерного ИК-излучения с длиной волны 1,06 мкм для формирования специальной микроструктуры в хрящевой ткани // *Российский химический журнал (Журнал Российского химического общества)*. 2021. Т. 64, № 3. С. 62–66. EDN: DHCRQO doi: 10.6060/rcj.2021653.8
3. Baranovskii D., Demner J., Nürnbergger S., et al. Engineering of tracheal grafts based on recellularization of laser-engraved human airway cartilage substrates // *Cartilage*. 2022. Vol. 13, N 1. EDN: PYYBNO doi: 10.1177/19476035221075951
4. Liu Y., Cao Y. Generation of ear cartilage for auricular reconstruction. In: Eberli D., Lee S.J., Traweger A., editors. *Organ tissue engineering*. Springer Cham, 2020. P. 1–25
5. Chen W., Li C., Peng M., et al. Autologous nasal chondrocytes delivered by injectable hydrogel for *in vivo* articular cartilage regeneration // *Cell Tissue Bank*. 2018. Vol. 19, N 1. P. 35–46. doi: 10.1007/s10561-017-9649-y

Юдинцева Н.М.^{1,2} ✉, Колесниченко Ю.В.¹, Шатрова А.Н.¹, Аксенов Н.Д.¹, Ярцева Н.М.¹, Шевцов М.А.^{1,2}, Федоров В.С.^{1,2}, Зиганшин Р.Х.³, Хотин М.Г.¹, Михайлова Н.А.¹

Поиск перспективных молекул-мишеней для лечения или профилактики патологических рубцов

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «НМИЦ им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

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

✉ yudintceva@mail.ru

Аннотация. Получено две линии фибробластов из гипертрофированного рубца (линия HTSF) и прилегающей к нему нормальной кожи (линия NDF). Клеточные линии различаются по свойствам, что позволяет использовать их в качестве *in vitro* модели для изучения молекулярных механизмов формирования гипертрофического рубца.

Ключевые слова: нормальные и рубцовые фибробласты; фенотип; пролиферация; клеточная подвижность; секретом; белки растворимой и везикулярной фракций.

Yudintceva N.M.^{1,2}, Kolesnichenko Y.V.¹, Shatrova A.N.¹, Aksenov N.D.¹, Yartseva N.M.¹, Shevtsov M.A.^{1,2}, Fedorov V.S.^{1,2}, Ziganshin R.H.³, Khotin M.G.¹, Mikhailova N.A.¹

The search for promising target molecules for treatment or prevention of pathological scars

¹ Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia

² Almazov NMRC, Saint Petersburg, Russia

³ Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Abstract. Two cell lines of dermal fibroblast were obtained from hypertrophic scar (line HTSF) and adjacent normal skin (line NDF). Both cell lines had physiological differences which allows them to be used as an *in vitro* model for studying the molecular mechanisms of skin hypertrophic scar formation.

Keywords: hypertrophic scar; normal and scar fibroblasts; karyotype; proliferation; cell motility; secretome; soluble and vesicular phase.

Восстановление значительных повреждений кожи часто происходит с образованием патологических рубцов, которые нарушают структуру и функцию тканей [1, 2]. Одной из актуальных задач регенеративной медицины по-прежнему остается поиск подходов и возможностей для направленной регуляции этого процесса. Наиболее значимыми участниками при формировании гипертрофических рубцов являются дермальные фибробласты (ДФ), свойства которых изучают с целью выявления молекулярных и клеточных механизмов, лежащих в основе патогенеза рубцовой ткани. Несмотря на простое описание фенотипа, ДФ демонстрируют высокую гетерогенность, связанную с их анатомическим расположением в ткани, полом и возрастом донора и т. д., что обуславливает их функциональное разнообразие. Оценка свойств ДФ, выделенных из кожи гипертрофированного рубца и прилегающей к ней нормальной ткани одного и того же донора, исключает влияние вышеперечисленных факторов, а анализ клеточного секретомата позволяет идентифицировать и охарактеризовать различные белки, которые могут быть вовлечены в процессы формирования рубцов. Целью данной работы является получение и сравнительная оценка функциональных свойств линий ДФ, выделенных из кожи гипертрофического рубца (hypertrophic scar fibroblasts (HTSFs)) и прилегающей к ней нормальной ткани (normal dermal fibroblasts (NDFs)), а также выявление в клеточном

секретоме потенциальных молекул-мишеней для разработки способов предотвращения фиброза тканей и эффективных методов терапии патологических рубцов. Для оценки различных функциональных свойств ДФ использовали методы проточной цитофлуориметрии, конфокальной, трансмиссионной и прижизненной микроскопии. Белковый состав определяли при помощи методов жидкостной хроматографии и LC-MS/MS масс-спектрометрии, полученные данные анализировали в программе Cytoscape. При сходных морфологических и фенотипических характеристиках сравнительный анализ выявил повышенную пролиферацию и клеточную подвижность для клеток линии HTSF по сравнению с NDF. Разделение клеточного секрета на растворимую и везикулярную фракции позволило более детально оценить белковый состав и идентифицировать уникальные группы и индивидуальные белки в каждой из групп. Можно предположить, что более высокая пролиферативная активность и клеточная подвижность HTSFs могут быть связаны с количественным и качественным составом белков, секретируемых клетками. Кроме того, только в везикулярной фракции клеток линии HTSF были выявлены специфические белки, участвующие в клеточной пролиферации (Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase K) и подвижности клеток (Catenin delta-1), а также ряд белков, которые могут играть существенную роль в фиброзе и воспалении (Mucin-5B, CD97, adhesion G protein-coupled receptor E2, antileukoproteinase, protein S100-A8 и S100-A9 и protein caspase recruitment domain-containing protein 14). Дальнейшие исследования позволят определить наиболее перспективные молекулы-мишени для разработки стратегии лечения или профилактики формирования патологических рубцов. Получение клеточных линий ДФ с различными свойствами от одного и того же донора позволяет использовать их в качестве *in vitro* модели для изучения молекулярных и клеточных механизмов формирования гипертрофического рубца.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1063).

Список литературы

1. Guo S., Dipietro L.A. Factors affecting wound healing // J Dent Res. 2010. Vol. 89, N. 3. P. 219–229. doi: 10.1177/0022034509359125
2. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., et al. Wound repair and regeneration // Nature. 2008. Vol. 453, N 7193. P. 314–321. doi: 10.1038/nature07039

Юрканова М.Д.¹ ✉, Кошелева Н.В.¹, Теплова А.А.¹, Тимашев П.С.^{1–3}, Власова И.И.¹

Продукция H_2O_2 различными фенотипами провоспалительных макрофагов M1 человека: пролонгация окислительного стресса, опосредованного миелопероксидазой нейтрофилов

¹ Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

² Центр мирового уровня «Цифровой биодизайн и персонализированное здравоохранение» ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия

³ Химический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

✉ yurkanova.masha@yandex.ru

Аннотация. При имплантации материалов активируется врожденный иммунитет, в котором главную роль играют нейтрофилы и провоспалительные M1 макрофаги. Процесс воспаления регулируется цитокинами, а различия в продукции активных форм кислорода у макрофагов подчеркивают их различные функции в восстановлении тканей.

Ключевые слова: макрофаги; нейтрофилы; THP-1 клетки; активные формы кислорода; люминол-зависимая хемилюминесценция.

Yurkanova M.D.¹, Kosheleva N.V.¹, Teplova A.A.¹, Timashev P.S.^{1–3}, Vlasova I.I.¹

H_2O_2 production by different types of human pro-inflammatory M1 macrophages: prolongation of neutrophil myeloperoxidase-mediated oxidative stress

¹ Institute for Regenerative Medicine, Sechenov University, Moscow, Russia

² Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University, World-Class Research Center, Moscow, Russia

³ "Digital Biodesign and Personalized Healthcare", Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. Implantation of materials activates innate immunity, in which neutrophils and pro-inflammatory M1 macrophages play a key role. Inflammation is regulated by cytokines, and differences in the production of reactive oxygen species among macrophages emphasize their different functions in tissue repair.

Keywords: macrophages; neutrophils; THP-1 cells; reactive oxygen species; luminol-dependent chemiluminescence.

В ответ на имплантацию материалов и повреждение тканей в первую очередь активируется система врожденного иммунитета. Нейтрофилы и провоспалительные макрофаги в M1 состоянии — основные участники острой стадии воспаления [1]. Воспаление регулируется цитокинами, в том числе факторами роста, способствующими дифференцировке моноцитов в макрофаги. После повреждения окружающие клетки секретируют больше GM-CSF, далее продуцируется M-CSF [2]. За счет секретируемых фагоцитами ферментов и продукции активных форм кислорода (АФК) происходит подготовка ткани к регенерации и модификация скаффолдов. При активации фагоцитов мембран-связанная NADPH-оксидаза продуцирует супероксид анион-радикал, превращающийся под действием супероксиддисмутазы (СОД) в H_2O_2 — относительно стабильную молекулу, которая может активировать пероксидазы, в том числе миелопероксидазу нейтрофилов

(МПО) [1]. Роль окислительного стресса, опосредованного активацией нейтрофилов, в регенерации мало исследована, а окислительно-восстановительную активность макрофагов изучают на макрофагах мыши, отличающихся от клеток человека.

Цель работы — сравнить продукцию АФК для разных фенотипов активированных форбол-меристат-ацетатом (ФМА) провоспалительных M1 макрофагов человека и нейтрофилов. Нейтрофилы и моноциты выделяли из венозной крови. Макрофаги получали из двух типов клеток: моноцитов крови (monocyte-derived macrophages, MDM), которые дифференцировали в MDM с помощью факторов роста GM- или M-CSF [2], и клеток моноцитарной лейкемии THP-1 (Merck, SCC223), дифференцированных путем инкубации с ФМА. Все макрофаги поляризовали в M1 состояние, получив соответственно GM_M1, M_M1 и THP-1_M1. Измерение АФК-генерирующей способности клеток после активации ФМА проводили с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) [1]. Активация провоспалительных GM_M1 приводила к генерации оксидантов, она была невелика. Предположительно, супероксид радикал, продуцируемый NADPH оксидазой, не успевает окислить люминол, поскольку быстро превращается в H_2O_2 . Для оценки уровня продуцируемой макрофагами H_2O_2 использовали пероксидазу хрена (HRP) — аналог МПО. Мы получили, что способность M1 макрофагов человека продуцировать H_2O_2 можно ранжировать в порядке: THP-1_M1 < M_M1 < GM_M1. Высокая радикал-генерирующая активность GM_M1 сопровождается высоким уровнем секреции провоспалительного цитокина TNF- α , IL-6. При оценке нативности макрофагов GM_M1, активированных ФМА, с помощью Live/Dead test на основе кальцеина-AM и пропидия-йодида была отмечена их способность образовывать сфероид-подобные агрегаты из живых клеток.

Нейтрофилы окисляют люминол без добавления HRP, поскольку секретируют МПО. Добавление HRP привело к усилению сигнала ХЛ и позволило сопоставить уровень продукции H_2O_2 нейтрофилами и макрофагами.

Таким образом, уровень продукции H_2O_2 отличается для разных типов макрофагов в соответствии с задачами, которые выполняют эти клетки. GM_M1 появляются в очаге воспаления вслед за нейтрофилами, продолжают работу этих клеток: продуцируют в несколько раз больше H_2O_2 и провоспалительных цитокинов, чем M_M1, появляющиеся позднее. GM_M1 макрофаги имеют уровень продукции H_2O_2 , сопоставимый с нейтрофилами. Активированные нейтрофилы секретируют МПО, которая в присутствии H_2O_2 приводит к сильному окислительному стрессу. Оставшаяся в очаге воспаления МПО может использовать H_2O_2 GM_M1 для синтеза HOCl и пролонгирования окислительного стресса, что было показано измерением количества хлораминов таурина в среде активированных макрофагов в присутствии МПО. Понимание закономерностей формирования различных фенотипов макрофагов, их активности и провоспалительных характеристик необходимо для разработки методов контроля разных стадий воспаления при регенерации тканей.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 23-25-00497 <https://rscf.ru/project/23-25-00497/>.

Список литературы

1. Vlasova I.I., Suleimanov S.K., Mikhalechik E.V., et al. Redox-activation of neutrophils induced by pericardium scaffolds // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, N 24. doi: 10.3390/ijms232415468
2. Suleimanov S.K., Efremov Y.M., Klyucherev T.O., et al. Radical-generating activity, phagocytosis, and mechanical properties of four phenotypes of human macrophages // *Int J Mol Sci.* 2024. Vol. 25, N 3. P. 1860. doi: 10.3390/ijms25031860

Юркина Е.Г. ✉, Ефимов Д.Ю., Примакова Е.А., Назарова Е.А., Сыманович А.А., Романова И.А., Смольникова В.В., Янушевская Е.А., Дедюля Н.И., Кривенко С.И., Щерба А.Е.

Использование клеточной терапии мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из плацентарно-пуповинного комплекса, у пациентов с декомпенсированным циррозом печени

ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», Минск, Республика Беларусь

✉ ekatherina999@mail.ru

Аннотация. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), полученные из плацентарно-пуповинного комплекса человека, обладают иммуномодулирующими свойствами, а также способностью к секреции трофических факторов, которые способствуют регенерации поврежденных тканей, что обосновывает клиническое применение МСК у пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; плацентарно-пуповинный комплекс человека; клеточная терапия; декомпенсированный цирроз печени.

Yurkina E.G., Efimov D.Y., Nazarova E.A., Primakova E.A., Symanovich A.A., Romanova I.A., Smolnikova V.V., Yanusheuskaya E.A., Dedyulya N.I., Krivenko S.I., Shcherba A.E.

Cell therapy with placenta-umbilic cord complex derived mesenchymal stem cells in patients with decompensated liver cirrhosis

SI “Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology”, Minsk, Belarus

Abstract. Human placenta-umbilical cord complex derived mesenchymal stem cells (MSCs) have immunomodulatory properties, as well as the ability to secrete trophic factors that promote the regeneration of damaged tissues, which justifies the clinical use of MSCs in patients with decompensated liver cirrhosis.

Keywords: mesenchymal stem cells; human placental-umbilical complex; cell therapy; decompensated cirrhosis of the liver.

Объект исследования — мезенхимальные стволовые клетки (МСК) плацентарно-пуповинного происхождения, кровь пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Цель — оценить эффективность и безопасность клеточной терапии МСК, полученных из плацентарно-пуповинного комплекса, для лечения пациентов с декомпенсированным циррозом печени.

Культуры МСК были выделены из образцов плацент, полученных после проведения операции кесарева сечения от рожениц, подписавших информированное согласие на участие в исследовании. Жизнеспособность клеток определяли общепринятым методом по исключению трипанового синего. Для контроля качества клеток исследовали иммунофенотип с помощью проточной цитометрии. Концентрацию фактора роста гепатоцитов (HGF) определяли на анализаторе Luminex 200 мультиплексным анализом с использованием магнитных частиц в составе наборов Milliplex MAP Kit (Merck KGaA, Германия).

На основании высокой пролиферативной активности 39,71 [33,61; 67,74] ч, потенциала дифференцировки, а также уровня продукции HGF 68317 [27370; 100000] пг/мл, по сравнению с МСК, полученными из других тканей плацентарно-пуповинного комплекса, для терапии пациентов с декомпенсированным циррозом печени послужили МСК из хориальной пластинки.

В проспективное исследование были включены 12 пациентов с декомпенсированным циррозом печени. Средний возраст пациентов составил 44 [28; 67] года, с баллом по шкале MELD — 27 [11; 35]. Клетки вводили внутривенно из расчета 2 млн/кг массы тела пациента в 20–40 мл стерильного физиологического раствора. Критериями включения являлись: возраст старше 18 лет, общий билирубин > 100 ммоль/л, цирроз печени (Child C), потребность в стационарном лечении.

При оценке эффективности клеточной терапии установлено, что системное введение МСК не вызывает побочных явлений, не ассоциировано с осложнениями введения либо ухудшением клинической картины. У 92% пациентов наблюдалась стабилизация течения печеночной недостаточности, что в свою очередь позволило продлить срок ожидания трансплантации печени либо добиться возможности продолжения лечения на амбулаторном этапе. После системной терапии с применением МСК из плацентарно-пуповинного комплекса в 46% случаев пациентам была выполнена трансплантация печени. Эффективность клеточной терапии была подтверждена снижением уровня билирубина в среднем на 133 ммоль/л (с максимального значения на 39%) и на 60 ммоль/л в течение семи суток после введения. Отмечен прирост общего белка после терапии на 6 г/л (на 11%), а также стабилизация коагулопатии (снижение международного нормализованного отношения (МНО) на 0,37 (на 25%)).

Выводы. Терапия МСК плацентарного происхождения является безопасной и позволяет стабилизировать клиническое течение цирроза печени, а также обеспечить увеличение сроков ожидания трансплантации печени. Данный метод лечения может быть предложен в качестве эффективного альтернативного подхода к терапии декомпенсированного цирроза печени.

Юрова К.А. ✉, Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Тодосенко Н.М., Мелашченко О.Б.,
Лигатюк Д.Д., Иванов П.А., Хлусов И.А., Литвинова Л.С.

Кооперация стромальных стволовых и иммунокомпетентных клеток на *in vitro* модели регенерации костной ткани

ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта» Калининград, Россия

✉ kristina_kofanova@mail.ru

Аннотация. Ремоделирование кости — непрерывный процесс удаления старой кости путем ее резорбции остеокластами и образования новой — с участием остеобластов. Несмотря на многочисленные исследования, текущая парадигма физиологического ремоделирования не отвечает на вопросы формирования гемопоэтических стволовых клеток и их роли в этом процессе.

Ключевые слова: костная ткань; ССК; регенерация; остеодифференцировка; мононуклеарные клетки крови; ниша костного мозга; ремоделирование.

Yurova K.A., Khaziakhmatova O.G., Malashchenko V.V., Melashchenko O.B., Ligatyuk D.D.,
Ivanov P.A., Khlusov I.A., Litvinova L.S.

Cooperation of stromal stem and immunocompetent cells in an *in vitro* model of bone tissue regeneration

Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Abstract. Bone remodeling is a continuous process of removing old bone by resorption by osteoclasts and forming new bone with the participation of osteoblasts. Despite numerous studies, the current paradigm of physiological remodeling does not answer the questions of the formation of hematopoietic stem cells and their role in this process.

Keywords: bone tissue; bone marrow stem cells; regeneration; osteodifferentiation; blood mononuclear cells; bone marrow niche; remodeling.

Ремоделирование кости осуществляется посредством скоординированного функционирования трех клеточных типов, которые играют ключевую роль в метаболизме костного матрикса [1]: остеокластов; остеобластов и остеоцитов. Каскады клеточных реакций, участвующих в процессе костного ремоделирования, реализуются при участии клеток иммунной системы [2]. Клетки иммунной системы формируются из ограниченного числа гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), находящихся в костном мозге. Ниша костного мозга включает сложное микроокружение различных типов клеток (кроветворных и не кроветворных), а также внеклеточные компоненты, такие как внеклеточный матрикс, химические и физические факторы, что регулирует гомеостаз и регуляторную активность клеток иммунной системы [3].

Целью настоящей работы явилось выявление роли микроокружения ниши в регенерации костной ткани, в контексте изучения механизмов эффективной кооперации иммунных клеток и стромальных стволовых клеток.

Для реализации настоящего эксперимента был проведен цикл исследований, разделенных во времени, на пластиковой поверхности (2D-модель культивирования) и в присутствии трехмерных искусственных матриксов, имитирующих систему «регенерирующая кость/кроветворное микроокружение».

В качестве нормальных иммунокомпетентных клеток использовали мононуклеарные лейкоциты (МНК). Выделение МНК из лейкоцезвеси здоровых доноров проводилось стандартным методом центрифугирования

на градиенте плотности фиколл-урографин («Pharmacia», Швеция) ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$). Разрешение на проведение исследования получено в локальном этическом комитете Инновационного парка БФУ имени И. Канта (Протокол № 5 от 16 мая 2016 г.).

ССК выделялись из липоаспирата человека (Протокол № 1 от 28.02.2019 локального этического комитета БФУ имени И. Канта), как описано [4].

Титановые подложки из коммерчески чистого титана BT1.0, размером $10 \times 10 \times 1 \text{ мм}^3$ и с индексом шероховатости (Ra) 2–3 мкм, используемые для имитации *in vitro* состояния трехмерной (3D) культуры, имели двухстороннее покрытие из фосфатов кальция, нанесенное методом микродугового оксидирования на установке Microarc-3.0 (Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск) в анодном режиме [5].

Культивирование проводили в полной питательной среде (ППС). ППС состояла из α -MEM («Sigma-Aldrich», США), 10% инактивированной (56°C в течение 30 мин) сыворотки крови эмбрионов коров («Sigma-Aldrich», США), 2 мМ/л L-глутамин («Sigma-Aldrich», США), 100 Е/мкг/мл пенициллин/стрептомицин («Gibco Life Technologies», США). Культивирование проводилось в течение 48 ч/14 сут/21 сут при 37°C , во влажной атмосфере, 5% CO_2 .

Контрольными моделями служили монокультуры МНК на пластике (2D), 3D-монокультуры МНК, ССК на пластике (2D), 3D-монокультуры ССК.

Количественное определение факторов роста, про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, Eotaxin, FGF, G-CSF, GM-CSF, IFN-g, IP-10, MCP-1, MIP-1a, PDGF-bb, MIP1b, RANTES, TNF- α , VEGF) в супернатантах культур клеток проводили методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, «Bio-Rad», США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, «Bio-Rad», США).

Оценку остеодифференцировочного потенциала проводили методом цитологического окрашивания ализариновым красным после 21-суточного культивирования культур. Негативным контролем дифференцировки служила 2D-культура ССК в стандартной ППС. Фотографии окрашенных ализариновым красным культур получали с использованием программного обеспечения («Olympus Corporation», Филиппины) на лабораторном биологическом микроскопе для фазового контраста и документирования IX 51 S8F. Морфометрическое исследование окрашенных культур ССК проводили с использованием Image-J Software (National Institutes of Health, США).

Определение экспрессии мРНК исследуемых генов, ассоциированных с остеодифференцировкой ССК (*BMP2*; *BMP6*; *RUNX2*; *SMURF*; *TBX*; *ALPL*; *BGLAP*), проводили методом ПЦР на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США).

Количественное определение содержания остеокальцина в супернатантах 21-дневных культур ССК проводили методом иммуноферментного анализа, с использованием коммерческого набора N-MID Osteocalcin ELISA (Дания).

Статистическая обработка результатов осуществлялась с помощью программы IBM SPSS Statistics 20.

Исследование результатов смешанной двумерной (2D) культуры ССК и МНК на пластике показало достоверное повышение в супернатантах культур концентрации большинства изучаемых цитокинов, по сравнению с 2D-культурой МНК ($p < 0,05$).

Результаты, полученные при оценке смешанной 3D-культуры ССК и МНК, позволили выявить резкое увеличение содержания всего спектра исследуемых цитокинов по сравнению с 2D- и 3D-культурами МНК ($p < 0,05$).

Анализ экспрессии генов остеодифференцировки, по истечении 14 суток культивирования, позволил выявить статистически значимые изменения в смешанной 3D-модели сокультивирования МНК и ССК.

При окрашивании ализариновым красным на 21-е сутки культивирования было выявлено увеличение очагов минерализации в смешанной 3D-культуре МНК и ССК в сравнении с 2D-культурой ССК, 3D-культурой ССК, а также смешанной 2D-культурой ССК. Показано, что увеличение площади участков минерализации внеклеточного матрикса положительно коррелировало с повышением уровня остеокальцина в супернатантах клеточных культур.

Заключение. Таким образом, нами была выявлена важная роль иммунного микроокружения в модели *in vitro* регенерации костной ткани; показано, что кооперация иммунных и стромальных стволовых клеток приводит к эффективной клеточной регенерации.

Исследование выполнено при поддержке Государственного задания (FZWM-2020-0010).

Список литературы

1. Gerosa L. Bone-to-brain: a round trip in the adaptation to mechanical stimuli // *Front Physiol.* 2021. Vol. 12. doi: 10.3389/fphys.2021.623893
2. Harris N. Immunology: chronic effects of acute infections // *Nature.* 2015. Vol. 526, N 7574. P. 509–510. doi: 10.1038/526509a.
3. Fröbel J., Landspersky T., Percin G., et al. The hematopoietic bone marrow niche ecosystem // *Front Cell Dev Biol.* 2021. Vol. 9. doi: 10.3389/fcell.2021.705410
4. Zuk P.A., Zhu M., Mizuno H., et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies // *Tissue Eng.* 2001. Vol. 7, N 2. P. 211–228. doi: 10.1089/107632701300062859
5. Legostaeva E.V., Kulyashova K.S., Komarova E.G., et al. A physical, chemical and biological properties of micro-arc deposited calcium phosphate coatings on titanium and zirconium–niobium alloy // *Materialwisswerkst.* 2013. Vol. 44, N 2–3. P. 188–197. doi: 10.1002/mawe.201300107

Юсина П.В., Усакин Л.А. ✉, Шинин В.В., Кляйн О.И., Пантелеев А.А.

Гипоксия-зависимый регуляторный каскад Hif1 в эмбриогенезе кожных покровов лабораторных мышей

НИЦ Курчатовский Институт, Москва, Россия

✉ leousakin@gmail.com

Аннотация. Оценка влияния активности белка Hif1a на экспрессию «мастер-гена» дифференцировки эпителия p63 путем сравнительного анализа нормальных и нокаутных по Hif1a эмбрионов мыши указывает на участие Hif1a в регуляции ранних этапов (на стадиях E7-10) развития эпидермиса у эмбрионов мышей.

Ключевые слова: Hif1a; гипоксия; кожа; эпидермис; p63; эмбриогенез.

Yusina P.V., Usakin L.A., Shinin V.V., Klein O.I., Panteleyev A.A.

Hypoxia-dependent Hif1 pathway in mouse skin embryogenesis

NRC Kurchatov Institute, Moscow, Russia

Abstract. An assessment of the effect of Hif1a activity on the expression of the p63, epithelial differentiation “master gene”, by differential analysis of normal and Hif1a knockout mouse embryos indicates the involvement of Hif1a in the regulation of early stages (E7-10) of epidermal development in mouse embryos.

Keywords: Hif1a; hypoxia; skin; epidermis; p63; embryogenesis.

Известно, что процесс формирования эпидермиса (как в процессе эмбрионального развития, так и при ранозаживлении/регенерации) определяется экспрессией ряда структурных белков, которая, в свою очередь, зависит от работы сети транскрипционных факторов, основным из которых является p63 — «мастер-регулятор» эпидермальной дифференцировки. Показана также роль p63 в поддержании гомеостаза стволовых клеток волосяного фолликула. Хотя мишени активности p63 в ходе ранне-эмбриональной спецификации эпидермиса, при формировании эпидермального барьера, при индукции роста волоса, а также при ранозаживлении хорошо охарактеризованы, механизмы, контролирующие активность самого p63, остаются неизвестными, как и механизмы поддержания баланса между пролиферацией кератиноцитов эпидермиса/фолликула и терминальной дифференцировкой их дочерних клеток. Этот фундаментальный фактологический пробел оказывает негативное влияние на дальнейшее развитие биологии кожных покровов и соответствующих направлений исследовательской дерматологии и регенеративной медицины. Вместе с тем ряд данных указывает на связь градиентов кислорода (гипоксии) и активируемого ими регуляторного каскада HIF (hypoxia inducible factor) как с активностью p63 и генов кератинового комплекса, так и с балансом пролиферации и дифференцировки в развивающемся/восстанавливающемся эпидермисе.

Мы предполагаем, что активность HIF является важным фактором в процессе ранней спецификации и формирования эпидермиса как *in vivo* (в процессе эмбрионального развития и при ранозаживлении), так и *in vitro* (при формировании искусственных 3D-эквивалентов кожи в культуральной среде). Скорее всего, это предположение верно и с точки зрения индукции роста волосяного фолликула (анагена).

Для выявления роли Hif1-каскада в формировании покровных структур эмбриона мыши нами была проведена оценка паттернов экспрессии белков Hif1a, Hif2a, ARNT и p63 на ранних этапах эмбриогенеза (E7-E10) эмбрионов с нокаутом гена Hif1a и соответствующих контролей. Стабильная трансгенная линия Hif1aΔ/wt была получена путем скрещивания линий B6.129-Hif1atm3Rsjo/J (с флоксированным участком

гена Hif1a) и B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J (с Cre рекомбиназой под конститутивным промотором). Скрещивание мышей этой линии позволяет получить как эмбрионы дикого типа, так и нокаутные по Hif1a (Hif1a Δ/Δ), жизнеспособные примерно до стадии E9.5 эмбрионального развития.

Анализ экспрессии транскрипционных факторов Hif1a на стадиях E7.5 и E8.5 эмбрионов дикого типа показал ярко выраженную экспрессию и ядерную локализацию этих белков в покровных клетках эмбриона. На стадии E9.5 Hif1a не обнаруживается в клетках покровов ни антериорной, ни постериорной областей эмбриона, в отличие от белка ARNT, который детектируется во всех клетках покровного эпителия и локализован в ядрах. На предыдущей стадии, E8.5, экспрессия ARNT была характерна для отдельных клеток, тогда как спустя сутки эмбрионального развития она обнаруживается во всём покровном слое. Таким образом, учитывая, что Hif1a и ARNT являются необходимыми компонентами гипоксического гетеродимерного комплекса, на стадии E9.5 в покровной эктодерме можно предположить ранее не описанные механизмы его функционирования (ARNT-независимые).

Также нами был проведён анализ экспрессии транскрипционного фактора Hif2a на стадиях E7.5, E8.5 и E9.5 развития мышинного эмбриона дикого типа. Hif2a не обнаруживается на стадии E9.5 в клетках покровов ни антериорной, ни постериорной областей эмбриона, в отличие от белка ARNT, который детектируется во всех клетках покровного эпителия и локализован в ядрах. На стадии E8.5 экспрессия Hif2a в покровном слое похожа на экспрессию Hif1a. Таким образом, учитывая, что Hif2a также может образовать комплекс с ARNT, необходимо дальнейшее изучение возможной роли Hif2a в поддержании активности HIF комплекса в эмбриональной коже.

По предварительным данным паттерн экспрессии белка p63 у нокаутных по Hif1a эмбрионов существенно отличается от дикого типа, что предполагает роль HIF-зависимых механизмов в регуляции p63-зависимой детерминации покровных слоев эмбриона мыши.

Яглова Н.В.¹✉, Обернихин С.С.¹, Яглов В.В.¹, Назимова С.В.¹, Тимохина Е.П.¹, Цомартова Д.А.^{1,2}

Дисрегуляция морфогенеза как эффективная модель для выявления механизмов самоподдержания клеточных популяций с низким регенераторным потенциалом

¹ НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына ФГБНУ РНЦХ им. акад. Б.В. Петровского, Москва, Россия

² ФГАОУ ВО «Первый московский государственный медицинский университет», Москва, Россия

✉ yaglova@mail.ru

Аннотация. Использовали модель дисморфогенеза надпочечников, заключающуюся в изменении темпов программы постнатального развития мозгового вещества эндокринным дисраптором дихлордифенилтрихлорэтаном. Установлены новые механизмы самоподдержания популяции хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников.

Ключевые слова: хромаффинные клетки; надпочечник; физиологическая регенерация; дисморфогенетическая модель; эндокринные дисрапторы; транскрипционная регуляция.

Yaglova N.V.¹, Obernikhin S.S.¹, Yaglov V.V.¹, Nazimova S.V.¹, Timokhina E.P.¹, Tsomartova D.A.^{1,2}

Disregulation of morphogenesis as an effective model for identifying new mechanisms of self-maintenance of cell populations with low regenerative capacity

¹ A.P. Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Federal State Budgetary Scientific Institution “Petrovsky National Research Centre of Surgery”, Moscow, Russia

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), Moscow, Russia

Abstract. A model of adrenal dysmorphogenesis was used, which involved altered rate of postnatal development program of the medulla by the endocrine disruptor dichlorodiphenyltrichloroethane. New mechanisms of self-maintenance of the adrenal chromaffin cell population have been detected.

Keywords: chromaffin cells; adrenal gland; physiological regeneration; dysmorphogenetic model; endocrine disruptors; transcriptional regulation.

Исследования самообновления клеток с низким регенераторным потенциалом являются эвристически сложной задачей, требующей использования нестандартных моделей. В последние десятилетия была установлена способность многих новых химических соединений, введенных в хозяйственный оборот, оказывать негативное действие на функционирование эндокринной системы. Эти вещества получили название эндокринных дисрапторов, поскольку вызывали нарушение продукции, рецепции и сигналинга гормонов. Большинство эндокринных дисрапторов обладают способностью проникать через фетоплацентарный барьер и нарушать регуляцию морфогенетических процессов, то есть процессов закладки, развития, роста и физиологической регенерации органов. Одним из самых распространенных в экосистемах эндокринных дисрапторов является дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ). Это обусловлено как длительностью его распада, так и продолжающимся интенсивным использованием в противоэпидемических целях. В наших предыдущих работах было показано, что воздействие низких доз ДДТ на организм в течение пренатального, а затем постнатального периодов онтогенеза приводит к изменению программы развития хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников [1, 2]. В пубертатном периоде происходит торможение роста, а после

наступления половой зрелости, напротив, рост органа активируется. Хромаффинные клетки традиционно относят к клеткам с низким регенераторным потенциалом, а основой их физиологической регенерации считается митотическое деление единичных клеток. Наличие в популяции хромаффинных клеток мозгового вещества надпочечников низкодифференцированных предшественников остается спорным вопросом. В наших онтогенетических исследованиях мы установили, что в периоде полового созревания, когда надпочечники продолжают свой рост, в них отсутствуют *Ascl1*-положительные прогениторные клетки. Все хромаффинноциты являются высокодифференцированными, то есть активно синтезирующими тирозингидроксилазу клетками. Однако среди них обнаруживаются клетки, синтезирующие факторы плюрипотентности и морфогены *Oct4* и *Sonic Hedgehog*. К моменту завершения роста органа мы обнаружили снижение пролиферативной активности хромаффинных клеток и увеличение процента клеток, синтезирующих антипролиферативный фактор PRH. Важной особенностью было то, что подавление пролиферации клеток сопровождалось усилением активации канонического Wnt-сигналинга. Иммуногистохимическое исследование также не выявило наличия ранних предшественников и показало, что все хромаффинные клетки активно синтезируют тирозингидроксилазу. Тем не менее среди тирозингидроксилаза-синтезирующих клеток значительно увеличилось содержание клеток с синтезом и транслокацией в ядро транскрипционного фактора *Oct4* и лиганда *Sonic Hedgehog*. Эти данные указывали на способность клеток к дедифференцировке, что позволило нам выдвинуть гипотезу, что после прекращения роста органа одним из механизмов обновления клеточной популяции хромаффинноцитов в надпочечниках является создание среди высокодифференцированных хромаффинноцитов пула клеток, готовых к дедифференцировке и делению. Для подтверждения этой гипотезы мы использовали дисморфогенетическую модель пренатального и постнатального воздействия эндокринного дисраптора ДДТ на организм крысы. В пубертатном возрасте у крыс начиналось замедление роста мозгового вещества, о чем свидетельствовали пониженная пролиферативная активность, более высокие показатели численности клеток, синтезирующих антипролиферативный фактор PRH, и низкие показатели активации канонического Wnt-сигналинга. Мы установили, что ингибирование роста сопровождалось увеличением численности *Sonic Hedgehog*-положительных хромаффинноцитов. После наступления половой зрелости у крыс рост мозгового вещества активировался, то есть отмечалось усиление пролиферативной активности клеток. При этом содержание в мозговом веществе PRH-положительных хромаффинноцитов и клеток с активацией канонического Wnt-сигналинга было значительно меньше, чем у возрастного контроля. В растущем мозговом веществе обнаруживалось значительно меньшее число *Oct4*- и *Sonic Hedgehog*-позитивных клеток. Низкодифференцированные предшественники также отсутствовали. Таким образом, использование дисморфогенетической модели позволило получить данные, на основании которых существующая концепция регенерации мозгового вещества была дополнена новым положением: поддержание тканевого гомеостаза в мозговом веществе надпочечников в постнатальном онтогенезе может происходить не только за счет пролиферации хромаффинных клеток, но также и за счет создания пула высокодифференцированных хромаффинноцитов, готовых к дальнейшей дедифференцировке.

Список литературы

1. Yaglova N.V., Obernikhin S.S., Tsomartova D.A., et al. Impact of prenatal and postnatal exposure to endocrine disrupter DDT on adrenal medulla function // *Int J Mol Sci*. 2022. Vol. 23, N 9. P. 4912. doi: 10.3390/ijms23094912
2. Yaglova N.V., Nazimova S.V., Obernikhin S.S., et al. Developmental exposure to DDT disrupts transcriptional regulation of postnatal growth and cell renewal of adrenal medulla // *Int J Mol Sci*. 2023. Vol. 24, N 3. P. 2774. doi: 10.3390/ijms24032774

Якимова А.О., Клабуков И.Д. ✉, Барановский Д.С., Евстратова Е.С., Иванов С.А., Шегай П.В., Каприн А.Д.

Регуляторные ограничения в производстве биологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов в России: вызовы и пути решения

Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

✉ anna.prosovskaya@gmail.com

Аннотация. Производство биотехнологических продуктов в России строго регламентировано. Ряд требований к оборудованию и расходным материалам ограничивает использование новых технологий, что негативно сказывается на развитии отрасли. Предлагается разработка новых законодательных актов для оптимизации процессов.

Ключевые слова: GMP; биотехнологические лекарственные препараты; законодательные акты; перспективные технологии; правовые коллизии.

Yakimova A.O., Klabukov I.D., Baranovskii D.S., Evstratova E.S., Ivanov S.A., Shegay P.V., Kaprin A.D.

Regulatory constraints in the manufacture of biologics and biomedical cellular products in Russia: challenges and solutions

National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

Abstract. Production of biologics and cellular products in Russia is strictly regulated. A number of requirements for equipment and consumables limit the use of new technologies, which negatively affects the development of the industry. The development of new regulations is proposed to optimize the manufacturing processes.

Keywords: biotechnological products; GMP; advanced technologies; legislative acts.

Производство биотехнологических продуктов, включая биомедицинские клеточные продукты (БМКП), высокотехнологичные лекарственные препараты (ВТЛП) и биотехнологические лекарственные препараты (БТЛП), в настоящее время строго регламентировано целым рядом законодательных актов. Особые требования предъявляются как к условиям производства, так и используемому оборудованию и расходным материалам. Примером может служить требование обязательного проведения аудита поставщиков используемых реагентов и расходных материалов, а также необходимость использовать в производственном процессе только имеющие Регистрационное удостоверение (РУ) реагенты, расходные материалы и оборудование. Безусловно, эта мера необходима для обеспечения качества производимых биотехнологических продуктов в соответствии с правилами надлежащей производственной практики (GMP). В то же время столь жесткое регулирование существенно ограничивает спектр доступных к использованию в производственном процессе реагентов, расходных материалов и оборудования, что может негативно сказываться на развитии отрасли в целом в силу наличия ряда ограничений, включая санкционное давление недружественных стран-производителей и их отказ от получения РУ на территории России.

Примером может служить производство модифицированных Т-лимфоцитов для CAR-T терапии, где одними из факторов, определяющих качество препарата, являются число, жизнеспособность и функциональная активность модифицированных Т-клеток. Существует два принципиально отличающихся подхода

для производства такого рода препаратов: в закрытом и в открытом контуре. По сравнению с производством в открытых системах, использование закрытого контура имеет ряд существенных преимуществ, включая возможность размещения оборудования в помещениях класса чистоты «С», полную автоматизацию процесса, минимизацию риска перекрестной контаминации, снижение требований к квалификации обслуживающего персонала и ряд других. Вместе с тем на сегодняшний момент ни одна из имеющихся на рынке систем такого рода оборудования не имеет РУ в России, а значит, не может быть использована для производства биотехнологических продуктов, включая БМКП, БТЛП и ВТЛП. Альтернативный путь представляет собой производство препаратов для CAR-T терапии в открытых системах и предполагает мануальное выделение лимфоцитов из крови человека, перенос клеток в культуральные флаконы для генетической модификации и последующее культивирование во флаконах, клеточных фабриках либо биореакторах, в зависимости от требуемого количества клеток в конце производственного цикла.

Согласно данным литературы [1], использование биореакторов с мембранным газопроницаемым дном позволяет получить существенно больший выход и более высокую жизнеспособность клеток по сравнению с культивированием в классических культуральных флаконах и клеточных фабриках. Как следствие, экспансия Т-клеток в биореакторах позволила бы получить препарат для CAR-T терапии лучшего качества: с большим количеством жизнеспособных функционально-активных Т-клеток, нацеленных на нужный опухолевый антиген. Однако это невозможно в силу существующей законодательной базы: имеющиеся на рынке биореакторы с мембранным газопроницаемым дном не имеют РУ на территории России, и проведение аудита поставщика технически невозможно в силу политических причин. Таким образом, использование лучших на данный момент технологических решений невозможно в силу существующих ограничений на законодательном уровне.

Решением данной проблемы могла бы служить разработка дополнительных законодательных актов, регламентирующих использование реагентов, расходных материалов и оборудования, не имеющих на рынке аналогов с оформленным РУ, действующим на территории России, для производства БМКП, БТЛП и ВТЛП.

Список литературы

1. Dias J., Garcia J., Agliardi G., et al. CAR-T cell manufacturing landscape-Lessons from the past decade and considerations for early clinical development // *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2024. Vol. 32, N 2. doi: 10.1016/j.omtm.2024.101250

Якимова А.О.¹, Клабуков И.Д.^{1,2} ✉, Барановский Д.С.^{1,2}

Мобильные производственные модули для изготовления биотехнологических лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов по индивидуальным назначениям

¹ Национальный медицинский исследовательский центр радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

² Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы, Москва, Россия

✉ ilya.klabukov@gmail.com

Аннотация. Мобильные GMP-лаборатории — это передвижные установки для производства и контроля качества биопрепаратов. Они снижают инвестиционные затраты и обеспечивают быстрое развертывание в кризисных ситуациях. В России для их использования необходимы изменения в законодательстве.

Ключевые слова: GMP; биологические лекарственные препараты; законодательные ограничения; мобильные GMP-лаборатории; надлежащая производственная практика; производство биопрепаратов.

Yakimova A.O.¹, Klabukov I.D.^{1,2}, Baranovskii D.S.^{1,2}

Mobile manufacturing modules for custom fabrication of biotech pharmaceuticals and biomedical cell products

¹ National Medical Research Radiological Center, Obninsk, Russia

² Patrice Lumumba Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Mobile GMP laboratories are portable facilities for the production and quality control of biopharmaceuticals. They reduce investment costs and ensure rapid deployment in crisis situations. In Russia, regulatory changes are required for their use.

Keywords: biologics; GMP; good manufacturing practices; mobile GMP labs; regulatory limitations; biologics manufacturing.

Мобильные GMP-лаборатории — это специализированные передвижные лаборатории, которые соответствуют стандартам надлежащей производственной практики и предназначены для производства и контроля качества лекарственных средств, биопрепаратов, вакцин и других продуктов. Такие лаборатории обретают все большую популярность в современном производственном процессе в биотехнологической и фармацевтической отраслях, становясь важным инструментом для удовлетворения растущих потребностей в производстве безопасных и эффективных биопродуктов в условиях быстро изменяющегося рынка.

По сравнению со стационарной инфраструктурой, мобильные GMP-лаборатории имеют ряд неоспоримых преимуществ, в числе которых: снижение инвестиционных затрат по сравнению с постройкой стационарных GMP-лабораторий; возможность быстрого развертывания практически в любой локации, что особенно важно при возникновении чрезвычайных ситуаций, проведении полевых исследований, а также при необходимости производства препаратов в удаленных регионах с минимально развитой инфраструктурой. Модульная структура мобильных GMP-лабораторий дает возможность быстро адаптировать конструкцию конкретной лаборатории к меняющимся условиям и потребностям. Вместе с тем мобильные GMP-лаборатории обладают рядом существенных недостатков, во многом связанных с их конструктивными особенностями. Компактный размер модуля и необходимость транспортировки накладывает ограничения на габариты, вес и порядок размещения используемого оборудования внутри и снаружи такой лаборатории. В то же

время нестандартные условия эксплуатации могут привести к более быстрому износу этого оборудования по сравнению с размещением в стационарных помещениях. В ряде случаев для обеспечения всего производственного цикла может потребоваться несколько мобильных модулей, что требует разработки дополнительных технологических решений для соединения таких модулей между собой, а также для поддержания и контроля условий, отвечающих стандартам GMP соответствующего класса чистоты, во всем комплексе. Особые требования предъявляются и к персоналу: для надлежащей эксплуатации мобильных GMP-лабораторий необходим обученный персонал, способный работать и поддерживать стандарты GMP в нестандартных и экстремальных условиях.

В целом, несмотря на ряд ограничений и сложностей в эксплуатации, появление мобильных GMP-лабораторий существенно расширило возможности реализации целого спектра биотехнологических и медицинских проектов в различных странах мира, однако использование таких технологических решений на территории Российской Федерации затруднено. В настоящее время законодательство предусматривает необходимость производству лекарственных средств иметь фиксированный адрес, что не позволяет создавать мобильные сборные производственные модули для развертывания производства на месте, например в региональных медицинских центрах, зонах стихийных бедствий.

Вместе с тем разрабатываемые сегодня новые высокоэффективные биотехнологические лекарственные препараты имеют ограниченный срок годности, трудны в транспортировке и подготовке к применению, что требует наличия современных производств в каждом крупном городе страны. Особенно это касается производства лекарственных средств с ограниченным сроком применения, прежде всего клеточных препаратов. Кроме того, в условиях локальных эпидемий или чрезвычайных ситуаций требуется подготовка препаратов на месте в случае невозможности эвакуации в крупный город с соответствующей инфраструктурой (Москва, Санкт-Петербург, Новосибирск).

Использование мобильных промышленных модулей для производства лекарственных средств будет способствовать расширению территориальных возможностей применения высокотехнологичных лекарственных препаратов на основе клеточных продуктов, для которых транспортировка на дальние расстояния, риски нарушения холодовой цепи, замораживание и оттаивание существенно снижают терапевтические свойства. Решением может служить введение нового регулирования возможности мобильного производства в условиях надлежащей производственной практики (GMP), а именно ст. 9, ст. 17, ст. 18, ст. 33 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», касающихся адреса производителя, а также дополнение новым определением «идентификатор производственного модуля». Внедрение предлагаемой нормы позволит вывести на рынок целый класс нового производственного оборудования и снизить конечную стоимость продуктов за счет снижения издержек.

Яковлева А.С.¹✉, Голубенко М.А.¹, Ещанова Е.Е.¹, Дьякова Н.В.¹, Архипова С.С.^{1,2}, Нагиев К.К.², Ахмадиева Л.А.², Салафутдинов И.И.^{1,2}, Мухамедьяров М.А.²

Искусственные генно-инженерные микровезикулы, несущие терапевтические белки, для терапии бокового амиотрофического склероза на модели мышей FUS

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

✉ alonas917@gmail.com

Аннотация. Боковой амиотрофический склероз (БАС) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, поражающее мотонейроны головного и спинного мозга. Потенциально перспективными методами лечения считаются генно-клеточная терапия и субклеточные технологии, приводящие к замедлению нейродегенерации.

Ключевые слова: боковой амиотрофический склероз; искусственные генно-инженерные микровезикулы; трансгенные мыши FUS.

Yakovleva A.S.¹, Golubenko M.A.¹, Eschanova E.E.¹, Dyakova N.V.¹, Arhipova S.S.^{1,2}, Nagiyev K.K.², Akhmadieva L.A.², Salafutdinov I.I.^{1,2}, Mukhamedyarov M.A.²

Artificial genetically engineered microvesicles carrying therapeutic proteins for therapy of amyotrophic lateral sclerosis in the FUS mouse model

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Abstract. Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease affecting motoneurons in the brain and spinal cord. Gene cell therapy and subcellular technologies are considered to be potentially promising therapies for slowing neurodegeneration.

Keywords: amyotrophic lateral sclerosis; artificial genetically engineered microvesicles; FUS transgenic mice.

Исследование было посвящено изучению влияния разработанного терапевтического препарата на основе искусственных микровезикул, полученных из ADMSCs (мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани), модифицированных двумя целевыми генами — фактором роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиогенином (ANG). Цель исследования заключалась в морфометрической и количественной оценке реактивных астроцитов и Casp-3+ клеток на фоне двукратной ретроорбитальной трансплантации генно-везикулярного препарата в передних рогах серого вещества спинного мозга, в мышинной модели с мутацией, нарушающей ядерную локализацию PHK-связывающего белка FUS, которая служит экспериментальной моделью БАС. Анализ проводили при помощи иммунофлуоресцентной конфокальной микроскопии. Исследование включало следующие группы: трансгенные мыши FUS без лечения (FUS), трансгенные мыши FUS с двукратным введением микровезикул, полученных из генно-модифицированных мезенхимальных стволовых клеток (FUS-MV2); группу отрицательного контроля составили интактные мыши (WT).

Количественный анализ показал повышение числа как Casp-3+ мотонейронов, так и реактивных астроцитов в группе, не получавшей лечение; данные показатели были максимальными среди всех групп. Напротив, в группе, получившей двукратное введение микровезикул с целевыми белками, наблюдалось значительное

снижение (в 1,4 раза) гибели мотонейронов, что свидетельствует о возможном замедлении прогрессирования заболевания с помощью данного терапевтического вмешательства. Также группа мышей, получавших лечение, продемонстрировала снижение количества реактивных астроцитов в 3 раза и достигла по этому показателю значений контрольной группы. По морфометрической оценке, двукратная трансплантация микровезикулярного терапевтического препарата снижает выраженность астроглиоза, фенотип реактивных клеток схож с нормой, а следовательно, сокращается и нейровоспаление.

Достоверное сокращение числа реактивной астроглии и отсутствие гипертрофии клеток у животных с FUS, получивших лечение генетически модифицированными микровезикулами, свидетельствует о противовоспалительном эффекте, обусловленном как свойствами самих микровезикул, так и доставкой терапевтических белков VEGF и ANG. Исходя из того, что на фоне терапии было выявлено значительное сокращение астроглии и глиальных рубцов, а также схожесть морфологии Casp-3+ мотонейронов с интактным контролем, можно заключить, что генетически модифицированные микровезикулы потенциально могут рассматриваться как эффективные терапевтические агенты. Кроме того, восстановление нормального уровня реактивных астроцитов в группе, получившей лечение двукратным введением микровезикул, демонстрирует существенный терапевтический эффект. Так как в настоящий момент это направление терапии является малоизученным, работа имеет непосредственное теоретическое значение для дальнейших исследований. Представленные результаты вносят вклад в растущее число доказательств, подтверждающих целесообразность использования генно-клеточной терапии и субклеточных технологий в качестве перспективных направлений для разработки методов терапии БАС и других НДЗ человека.

Работа поддержана РФФ 23-15-00438.

Яковлева А.С.¹✉, Лайков А.В.¹, Лопухов Л.В.¹, Голубенко М.А.¹, Маркелова М.И.¹,
Мухамедьяров М.А.², Салафутдинов И.И.^{1,3}

Метаболические профили в модели прогрессирующего бокового амиотрофического склероза SOD1-G93A мышей

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

³ НМИЦ эндокринологии, Москва, Россия

✉ alonas917@gmail.com

Аннотация. Патогенез бокового амиотрофического склероза (БАС) многофакторный, и, как предполагается, ключевую роль в нем играют глобальные метаболические изменения. В связи с этим метаболомный анализ может служить инструментом для поиска биомаркеров БАС, оценки прогрессии заболевания и выявления новых терапевтических мишеней.

Ключевые слова: трансгенные мыши; боковой амиотрофический склероз; метаболомика; масс-спектрометрия; мониторинг множественных реакций; супероксиддисмутаза (SOD1).

Yakovleva A.S.¹, Laikov A.V.¹, Lopukhov L.V.¹, Golubenko M.A.¹, Markelova M.I.¹,
Mukhamedyarov M.A.², Salafutdinov I.I.^{1,3}

Metabolic profiles in the SOD1-G93A mouse model of progressive amyotrophic lateral sclerosis

¹ Kazan Federal University, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

³ NMRC of Endocrinology, Moscow, Russia

Abstract. The pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is multifactorial and global metabolic changes are thought to play a key role. In this regard, metabolomic analysis may serve as a tool to search for biomarkers of ALS, assess disease progression and identify new therapeutic targets.

Keywords: transgenic mice; amyotrophic lateral sclerosis; metabolomics; mass spectrometry; multiple reaction monitoring; superoxide dismutase (SOD1).

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся потерей кортикальных, стволовых и спинномозговых мотонейронов. Развитие БАС приводит к прогрессирующему нервно-мышечному нарушению и смерти обычно в течение 2–3 лет после постановки первичного диагноза. Механизмы, лежащие в основе дегенерации двигательных нейронов, остаются не выясненными. Более того, ни одно из доступных в настоящее время лекарств не останавливает развитие заболевания. Известно, что 10% всех случаев БАС ассоциированы с наследуемыми генетическими изменениями в гене супероксиддисмутазы (SOD1). На сегодняшний день процесс, с помощью которого мутантный SOD1 приводит к повреждению мотонейронов, до конца не выяснен. Однако окислительный стресс, эксайтотоксичность, нарушения в регуляции энергетического метаболизма и дисфункции митохондрий широко изучены как потенциальные триггеры заболевания. В частности, мыши, экспрессирующие мутантный человеческий ген SOD1, неизменно развивают моторный синдром с патологическими и симптоматическими критериями, соответствующими БАС. Как предполагается, сложный многофакторный патогенез заболевания ассоциирован с ключевой токсической ролью глобальных изменений в метаболизме. В связи с этим оценка изменений, происходящих в метаболомном профиле, представляет собой уникальный инструмент

для поиска и характеристики биомаркеров начала течения и прогрессии заболевания, а также выбора терапевтических мишеней для коррекции патофизиологического состояния.

В данном исследовании, с использованием методов таргетной метаболомики, на платформе SCIEX Qtrap 6500, мы одновременно исследовали 358 уникальных метаболита у трансгенных B6SJL-TG(SOD1-G93A) dl1Gur/J мышей на фоне прогрессирования заболевания. Образцы сыворотки крови собирали на пресимптоматической, в начале и на поздней (терминальной) стадии заболевания. Сгенерированные пики проверялись вручную в MultiQuant. Площади пиков экспортировались для дальнейшего анализа. Корреляции между концентрациями метаболитов в сыворотке крови анализировали с использованием пакета R Hmisc (на основе коэффициента ранговой корреляции Спирмена).

Проведенный анализ позволил нам идентифицировать в сыворотке крови трансгенных мышей 342 метаболита, ассоциированных с 43 разными биохимическими путями. Мы обнаружили 67 метаболитов, показавших значимые корреляции с прогрессией БАС у трансгенных SOD1G93A мышей. Наибольшая положительная корреляция с развитием заболевания была выявлена для аденозина и N-глицил-L-пролина, негативная — для глюкозамина и гликолевой кислоты. Кроме того, мы выявили изменения в уровнях метаболитов микробиома, с прогрессированием заболевания наблюдалось увеличение содержания 2-гидроксифенилуксусной кислоты, индола, метилфенилуксусной кислоты, p-аминогиппуровой кислоты, шикимовой кислоты, индоксилсульфата и имидазолуксусной кислоты.

Наши данные показывают, что с прогрессией заболевания происходит изменение метаболического фенотипа у трансгенных мышей. Выявленные метаболиты могут быть диагностическими маркерами и/или терапевтическими мишенями БАС. Исследование свидетельствует о потенциальной связи между центральной нервной системой и кишечником (brain gut axis) и предполагает ассоциацию микробиоты с течением патологического состояния. Однако необходимы более прямые доказательства, чтобы прояснить, как микробиота кишечника влияет на метаболом и улучшает или усугубляет течение БАС.

Яковлева С.А.¹✉, Юнусова А.М.², Чвилева А.С.¹, Шнайдер Т.А.²

Изучение роли рецепторов Notch1 и Notch2 в ранних этапах развития головного мозга человека на модели церебральных органоидов

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

✉ s.tschetschetkina@gmail.com

Аннотация. Сигнальный путь Notch является одним из ключевых для развития головного мозга. Однако его роль на ранних этапах у человека остается мало изученной. На модели церебральных органоидов человека было обнаружено, что ингибирование сигнального пути Notch приводит к дезорганизации их внутренней структуры.

Ключевые слова: сигнальный путь Notch; церебральные органоиды; биология развития; нейрогенез.

Yakovleva S.A.¹, Yunusova A.M.², Chvileva A.S.¹, Shnaider T.A.²

The role of the Notch1 and Notch 2 receptors in the early stages of human brain development using a model of cerebral organoids

¹ Novosibirsk state university, Novosibirsk, Russia

² Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Abstract. The Notch signaling pathway is one of the key pathways for brain development. However, its role in the early stages remains poorly understood. It was found that inhibition of the Notch signaling cascade leads to disorganization of internal structure in the human cerebral organoid.

Keywords: Notch signaling pathway; cerebral organoids; developmental biology; neurogenesis.

Развитие головного мозга — один из сложнейших процессов, происходящих в организме млекопитающих. В его регуляции участвуют несколько сигнальных каскадов. Одним из ключевых является сигнальный путь Notch. У млекопитающих данный сигнальный путь влияет на пролиферацию, а также на дифференцировку клеток радиальной глии (РГ) и нейронов как на самых ранних стадиях, так и на более поздних. Различные рецепторы сигнального пути Notch вносят разный вклад в развитие головного мозга [1]. Оказалось, что у мышей *Notch1* на ранних этапах является критически важным для образования клеток РГ, в то время как *Notch2* необходим для поддержания их популяции на более поздних стадиях. Однако у человека временные паттерны функционирования этого сигнального пути мало изучены. Кроме того, в силу некоторых эволюционных изменений в регуляции активности сигнального пути Notch у человека [2, 3], реконструировать все аспекты патофизиологии, связанные с этим каскадом, не представляется возможным на лабораторных животных. Благодаря разработке технологии церебральных органоидов стало возможным воспроизведение ранних этапов развития головного мозга человека *in vitro* [4]. Для исследования роли сигнального пути Notch была выбрана стратегия селективного ингибирования *NOTCH1* и *NOTCH2* при помощи РНК-интерференции. В результате мы обнаружили, что при понижении экспрессии *NOTCH1* в органоидах нарушался процесс люменизации и определения клеточной судьбы. Эти органоиды обладали меньшими размерами, упрощенным внешним и внутренним строением. А также в них происходило нарушение формирования апикальной мембраны. Кроме того, количество клеток РГ было значительно меньше, при этом

они не были структурированы, в отличие от контрольной группы. Таким образом, при уменьшении экспрессии NOTCH1 происходит нарушение формирования клеток РГ на ранних этапах нейрогенеза, что приводит к дезорганизации внутренней структуры церебральных органоидов. Работа выполнена при поддержке 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 общепрограммного и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН. Микроскопический анализ проведен на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

Список литературы

1. Mase S., Shitamukai A., Wu Q., et al. Notch1 and Notch2 collaboratively maintain radial glial cells in mouse neurogenesis // *Neurosci Res.* 2021, Vol. 170. P. 122–132. doi: 10.1016/j.neures.2020.11.007
2. Fiddes I.T., Lodewijk G.A., Mooring M., et al. Human-specific NOTCH2NL genes affect notch signaling and cortical neurogenesis // *Cell.* 2018. Vol. 173, N 6. P. 1356–1369. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.051
3. Suzuki I.K., Gacquer D., Van Heurck R., et al. Human-specific NOTCH2NL genes expand cortical neurogenesis through delta/notch regulation // *Cell.* 2018. Vol. 173, N 6. P. 1370–1384. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.067
4. Lancaster M.A., Knoblich J.A. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells // *Nat Protoc.* 2014. Vol. 9, N 10. P. 2329–2340. doi: 10.1038/nprot.2014.158

Якубец Д.А. ✉, Маркина Е.А., Тырина Е.А., Буравкова Л.Б.

Высокопоточный автоматизированный анализ изображений гетероклеточных микроэксплантов костного мозга мышей с помощью Cellprofiler и Cellpose

ГНЦ РФ-ИМБП РАН, Москва, Россия

✉ lizard_96@mail.ru

Аннотация. В данной работе рассматривается применение программы Cellprofiler с внедрённым универсальным алгоритмом сегментации клеток на основе нейронных сетей Cellpose для анализа изображений гетероклеточных микроэксплантов костного мозга мышей после 14-суточного воздействия моделированной микрогравитации.

Ключевые слова: микроскопия; анализ изображений; Cellpose; Cellprofiler; костный мозг; микрогравитация.

Yakubets D.A., Markina E.A., Tyrina E.A., Buravkova L.B.

High-throughput automated image analysis of heterocellular mouse bone marrow microexplants using Cellprofiler and Cellpose

Institute of Biomedical Problems (IBMP), Russian Academy of Sciences (RAS), Moscow, Russia

Abstract. This study discusses the use of the Cellprofiler program with the implemented Cellpose — a generalist cell segmentation algorithm based on neural networks to analyze the mouse bone marrow heterocellular microexplants images after 14 days of exposure to simulated microgravity.

Keywords: microscopy; image analysis; Cellpose; Cellprofiler; bone marrow; microgravity.

В настоящее время в биомедицинских исследованиях используются гетероклеточные культуры, в том числе гетеросфероиды и микроэкспланты, состоящие из разных типов клеток. Применение такого подхода позволяет создать для клеток более «физиологичные» условия, учитывая контактные и паракринные межклеточные взаимодействия. Получение объективных данных комплексного анализа этих систем — одна из актуальных задач современной биомедицинской науки. Анализ гетерогенных клеточных популяций является сложной и во многом нерешённой задачей. Различные виды микроскопии, в частности флуоресцентная, позволяют производить съёмку клеток в относительно «естественном» состоянии, за счёт исключения ферментативной обработки, которая проводится, например, в проточной цитометрии. В данный момент появляются и совершенствуются методы автоматизированной микроскопии и обработки изображений, позволяющие получать и анализировать большие объёмы объективных данных. Cellprofiler — бесплатная программа с открытым исходным кодом, разработанная для высокопоточного (high-throughput) автоматизированного анализа клеток, позволяющая получать до сотен различных морфометрических параметров клеток и ядер, включая размер, форму, площадь, интенсивность окрашивания и распределение внутриклеточных структур [1]. В основе её работы лежит так называемая сегментация — процесс нахождения клеток на изображении и создание на их основе областей интереса (ROI), внутри которых будут проводиться необходимые измерения и расчёты. Улучшить и ускорить процесс сегментации возможно с применением нейронных сетей, например универсального алгоритма сегментации клеток Cellpose [2]. Этот алгоритм имеет возможность обучения на пользовательских данных, что потенциально позволяет проводить анализ культур практически любого состава. В данной работе мы предприняли попытку применить Cellprofiler

с внедрённым алгоритмом Cellpose для анализа транслокации транскрипционного фактора RUNX2 по его ядерно-цитоплазматическому соотношению в гетероклеточных адгезионных микроэксплантах костного мозга мышей после 14-дневного моделирования эффектов микрогравитации. Моделирование осуществляли непрерывным вращением флаконов с клетками на приборе «Gravite» (Space Bio-Laboratories Co., Ltd, Япония). Во время вращения вектор гравитации постоянно менял направление, воссоздавая эффекты снижения гравитационного поля. Экспозиция происходила в термостате при 37 °С. Контрольные клетки инкубировали параллельно в тех же условиях без клиностаტიрования. После экспозиции клетки костного мозга фиксировали 4% параформальдегидом и окрашивали флуоресцентными антителами против RUNX2, а также против поверхностного маркера CD45, для разделения клеточной популяции на положительные и негативные по данному маркеру. Ядра клеток окрашивали DAPI. Далее проводили обучение Cellpose на более 500 ROI для сегментации различных типов клеток, дальнейший анализ проводили с помощью Cellprofiler. Всего было обработано 60 изображений, суммарное количество анализируемых клеток превышало 15 000. Наибольшую часть микроэксплантов составляли мелкие CD45+ клетки (до 96%). По полученным данным, ядерно-цитоплазматическое соотношение RUNX2 в этих клетках снижалось на 30% в условиях моделирования эффектов микрогравитации. Для всех CD45-клеток также происходило снижение ядерно-цитоплазматического соотношения на 50% в экспериментальных условиях, что согласуется с данными о замедлении остеодифференцировки в условиях микрогравитации. Таким образом, совместное применение Cellprofiler и Cellpose позволяет производить достаточно адаптивный высокопоточный и во многом автоматизированный анализ гетероклеточных культур, что, однако, не отменяет последующую обязательную валидацию корректности сегментации и полученных данных исследователем.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 23-25-0071.

Список литературы

1. Stirling D.R., Swain-Bowden M.J., Lucas A.M., et al. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability // BMC Bioinformatics. 2021. Vol. 22, N 1. P. 433. doi: 10.1186/s12859-021-04344-9
2. Stringer C., Wang T., Michaelos M., et al. Cellpose: a generalist algorithm for cellular segmentation // Nat Methods. 2021. Vol. 18. P. 100–106. doi: 10.1038/s41592-020-01018-x

Япрынцева М.А.^{1,2} ✉, Первушин Н.В.^{1,2}, Сазонова Е.В.², Копейна Г.К.^{1,2},
Байрамова Д.О.¹, Животовский Б.Д.^{1–3}

Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с приобретенной устойчивостью к химиотерапевтическому препарату цисплатину

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

² Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

³ Отделение токсикологии, Институт медицины окружающей среды, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

✉ smariaal@mail.ru

Аннотация. Развитие устойчивости к цисплатину может изменять метаболическую и пролиферативную активность опухолевых клеток. Во всех устойчивых линиях запуск гибели клеток был ингибирован. В двух из этих линий клеток наблюдали подавление пролиферации и дыхательной активности.

Ключевые слова: цисплатин; лекарственная устойчивость; апоптоз; метаболизм; пролиферация.

Yapryntseva M.A.^{1,2}, Pervushin N.V.^{1,2}, Sazonova E.V.², Kopeina G.S.^{1,2}, Bayramova D.O.¹, Zhivotovsky B.^{1–3}

Metabolism and proliferation analysis of tumor cells with acquired resistance to chemotherapeutic drug cisplatin

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Faculty of Medicine, MV Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

³ Division of Toxicology, Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Abstract. The development of resistance to cisplatin may alter metabolic and proliferative activity of cancer cells. In all resistant lines, the process of cell death induction was inhibited. In two of them, suppression of proliferation and respiratory activity were observed.

Keywords: cisplatin; drug resistance; apoptosis; metabolism; proliferation.

Цисплатин является эффективным противоопухолевым препаратом, используемым для лечения различных злокачественных новообразований. Его действие основано на ковалентном связывании с пуриновыми основаниями и образовании межцепочечных сшивок ДНК. Такое повреждение ДНК приводит к подавлению репликации, аресту клеточного цикла и запуску программируемой гибели клеток (ПГК), в том числе апоптоза [1]. Однако опухолевые клетки могут приобретать устойчивость к его действию, что приводит к снижению эффективности лечения. Такая приобретённая устойчивость является серьёзной проблемой в терапии опухолей. В основе нечувствительности к цисплатину лежат несколько механизмов, включая снижение уровня препарата в клетке за счёт регуляции его транспорта, мутации в онкосупрессорных генах, репарация ДНК, эпигенетическая регуляция и другие [2]. В результате резистентные клетки приобретают специфический фенотип, характеризующийся избеганием ПГК и модуляцией пролиферативной и метаболической активности.

Метаболические изменения при развитии устойчивости к препарату разнообразны и включают в себя, в первую очередь, перестройку метаболизма глюкозы, а также аминокислот и липидов. Снижение чувствительности к цисплатину также часто сопровождается активацией аутофагии, обеспечивающей активно делящиеся раковые клетки энергией и материалами для биосинтетических путей. Часто резистентные клетки демонстрируют усиление эффекта Варбурга и активацию гликолиза; однако в некоторых случаях происходит

обратный метаболический сдвиг и повышение уровня окислительного фосфорилирования. Такие изменения метаболизма позволяют клеткам более эффективно производить энергию и сохранять жизнеспособность в условиях стресса [3]. Тем не менее действие цисплатина основано как на цитотоксических, так и на цитостатических эффектах; поэтому механизмы резистентности могут различаться.

В данной работе для получения клеточных линий, устойчивых к действию цисплатина, клетки культивировали с постепенно увеличивающимися концентрациями препарата. Такой подход имитирует поступление препарата в организм в ходе курсового лечения пациентов и является наиболее клинически значимым. Таким образом были получены четыре цисплатин-резистентные линии опухолевых клеток различного происхождения: аденокарцинома лёгкого A549, крупноклеточный рак лёгкого U1810, колоректальный рак SW620 и рак яичника SKOV3. Методом вестерн-блот в этих клетках исследовали изменение содержания различных белков, вовлечённых в регуляцию апоптоза, аутофагии и пролиферации, метаболическую активность и клоногенную способность.

Содержание маркеров апоптоза (активная форма каспазы-3 и фрагмент p89 ПАРП) было снижено во всех исследованных устойчивых линиях по сравнению с исходными. У резистентной линии U1810 также наблюдалось повышение маркера ферроптоза GPX4, фермента, защищающего клетки от перекисного окисления липидов. Ферроптоз — тип ПГК, индуцируемый цисплатином помимо апоптоза. Повышение данного фермента может являться одним из механизмов возникновения устойчивости. Таким образом, резистентные клетки защищаются от разных типов ПГК.

У трёх исследованных линий (A549, U1810, SKOV3) цисплатин снижал дыхательную активность, что может быть вызвано изменением работы митохондрий. Для двух из них — A549 и U1810 — было обнаружено, что развитие устойчивости сопровождалось снижением метаболической и пролиферативной активности. У линии A549 также наблюдалось снижение активации митоген-активируемых киназ JNK1/2 и p38. Таким образом, эти две линии клеток при возникновении устойчивости к цисплатину приобретали фенотип, характеризующийся низкой пролиферативной и метаболической активностью, позволяющий им пережить токсическое воздействие.

У линии SKOV3 также наблюдали снижение уровней дыхания и гликолиза, однако клоногенная способность не отличалась между чувствительными к цисплатину и резистентными клетками. При этом возникновение устойчивости сопровождалось активацией аутофагии. У наиболее метаболически активной линии SW620 не было обнаружено изменений метаболической активности ни при обработке цисплатином, ни при выведении устойчивой линии.

Полученные данные свидетельствуют, что развитие резистентности к действию цисплатина формируется в разных клетках при помощи различных механизмов и сопровождается изменениями метаболизма и скорости пролиферации.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 23-74-30006).

Список литературы

1. Shaloam D., Tchounwou P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action // *Eur J Pharmacol.* 2014. Vol. 740. P. 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin
2. Fu R., Zhao B., Chen M., et al. Moving beyond cisplatin resistance: mechanisms, challenges, and prospects for overcoming recurrence in clinical cancer therapy // *Med Oncol.* 2023. Vol. 41, N 1. P. 9. doi: 10.1007/s12032-023-02237-w
3. Pavlides S., Whitaker-Menezes D., Castello-Cros R., et al. The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8, N 23. P. 3984–4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238

