

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ  
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ МГУ ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

# СБОРНИК ТЕЗИСОВ



V ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

**СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ  
И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА**

18-21 НОЯБРЯ

МОСКВА 2013

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ  
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ  
РОССИЙСКИЙ ФОНД ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК  
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ МГУ ИМ. ЛОМОНОСОВА

# **СБОРНИК ТЕЗИСОВ**

**V ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ  
И РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА**

**18-21 НОЯБРЯ**

**МОСКВА 2013**

УДК 576:616  
ББК 28.03:52  
С78

**С78 Стволовые клетки и регенеративная медицина:**

V Всероссийская научно-практическая конференция; 18–21 ноября 2013 г.:

Сборник тезисов. – М.: МАКС Пресс, 2013. – 88 с.

ISBN 978-5-317-04609-5

Настоящее издание представляет собой сборник тезисов V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». В нем представлены результаты фундаментальных и прикладных исследований, касающихся молекулярных и клеточных механизмов репарации и регенерации тканей, и участие в этих процессах стволовых и прогениторных клеток.

Издание предназначено для врачей и ученых, занимающихся исследованиями в данной области, аспирантов, студентов медицинских и естественнонаучных факультетов высших учебных заведений. Выполнено в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований 13-04-06123 оф-г.

*Ключевые слова:* регенеративная медицина, стволовые и прогениторные клетки, генная и клеточная терапия, тканевая инженерия.

УДК 576:616  
ББК 28.03:52

**Stem cells and regenerative medicine:**

5th Russian National Science and Applied Research Conference; November 18–21, 2013. – М.: MAKS Press, 2013. – 88 p.

In this book the abstracts of the 5th Russian National Science and Applied Research Conference «Stem cells and regenerative medicine» are presented. It represents the results of fundamental and applied research related to the molecular and cell mechanisms of tissue repair and regeneration as well as the role of stem and progenitor cells in these processes.

The abstract book is intended for physicians and researchers working in this field, students and PhD students of medical and life sciences faculties. The publication is performed under grant 13-04-06123 of-g by the Russian Foundation of Basic Sciences.

*Key words:* regenerative medicine, stem and progenitor cells, gene and cell therapy, tissue engineering.

ISBN 978-5-317-04609-5

© Факультет фундаментальной медицины  
МГУ имени Ломоносова 2013

# ОГЛАВЛЕНИЕ

---

<b>Глюкагон–продуцирующие клетки островков могут быть источником восстановления поджелудочной железы после повреждения</b>	<b>1</b>
Абдулхакова А.Р., Трондин А.А., Певнев Г.О., Мавликеев М.О., Галяиева А.Р., Гумерова А.А., Абдулхаков С.Р., Киясов А.П.	
<b>Влияние мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика на лимфоциты, активированные аллергеном</b>	<b>2</b>
Айзенштадт А.А., Супильникова О.В., Смолянинов А.Б., Самойлович М.П., Климович В.Б.	
<b>Неканонические нейральные стволовые/прогениторные клетки человека</b>	<b>3</b>
Александрова М.А., Кузнецова А.В., Ржанова Л.А.	
<b>Влияние белков внеклеточного матрикса на способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга к дифференцировке в остеогенном и адипогенном направлениях</b>	<b>4</b>
Александрова С. А., Воронкина И.В., Пинаев Г. П.	
<b>Сравнение параметров роста МСК мышцы в условиях 2D и 3D культивирования</b>	<b>5</b>
Андреева Н.В., Бонарцев А.П., Жаркова И.И., Белявский А.В.	
<b>Роль рецептора урокиназы (uPAR) и щелевых контактов в механизмах ангиогенного действия мезенхимальных стромальных клеток на модели со-культивирования с эндотелиальными клетками человека <i>in vitro</i></b>	<b>6</b>
Аниол Н.В., Воротников А.В., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.	
<b>Терапевтический потенциал аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в комплексном лечении переломов проксимального отдела бедренной кости</b>	<b>7</b>
Багаева В.В., Малько А.В., Смолянинов А.Б., Савинцев А.М.	
<b>Влияние интерлейкина-1 бета на экспрессию генов-маркеров дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток</b>	<b>8</b>
Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Шипунова И.Н. Дризе Н.И.	
<b>Влияние аллогенных ФГА–активированных мононуклеаров на ММСК при пониженной концентрации кислорода</b>	<b>9</b>
Бобылёва П.И., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.	
<b>Влияние G-CSF на функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью</b>	<b>10</b>
Бондаренко Н.А., Лыков А.П., Ким И.И., Повещенко О.В., Повещенко А.Ф., Покушалов Е.А., Романов А.Б., Караськов А.М., Коненков В.И.	
<b>Иммунорегуляция и паракринная активация мезенхимальных стромальных клеток: две стороны одного процесса</b>	<b>11</b>
Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р.	
<b>Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов и линии клеток саркомы человека</b>	<b>12</b>
Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б.	

---

---

<b>Исследование <i>in vitro</i> биологических свойств мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих</b>	<b>13</b>
Васильев Р.Г., Родниченко А.Е., Литвинова Л.С., Лабунец И.Ф., Новикова С.Н., Бутенко Г.М.	
<b>Эффект действия белков, полученных из культивированных мезенхимальных стволовых клеток и ферментов–антиоксидантов при лечении термических ожогов органов дыхания</b>	<b>15</b>
Волкова А.Г., Темнов А.А., Новоселов В.И.	
<b>Исследование жизнеспособности клеток, засеянных на синтетический каркас трахеи</b>	<b>16</b>
Гилевич И.В., Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Куевда Е.В., Хааг Й., Ф. Юнгеблут, Федоренко Т.В., Пашкова И.А., Поляков И.С., Порханов В.А., Маккиарини П.	
<b>Исследование влияния комбинации VEGF165 и HGF на ангиогенез в ишемизированном миокарде крысы и продукцию хемокинов эндотелием</b>	<b>17</b>
Глуханюк Е.В., Галлинггер Ю.О., Макаревич П.И., Парфенова Е.В.	
<b>Характеристика мононуклеаров костного мозга мышей после длительного космического полета</b>	<b>19</b>
Гончарова Е.А., Бобылева П.И., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.	
<b>Роль молекул адгезии в иммуносупрессорном механизме ММСК</b>	<b>20</b>
Горюнов К.В., Романов А.Ю., Рубцов Ю. П. , Ткачук В.А.	
<b>Продукция IL-6 и хемокинов в системе со-культивирования МСК жировой ткани и активированных моноцитов</b>	<b>21</b>
Григорьева О.А., Рубина К.А., Сысоева В.Ю.	
<b>Децеллюляризованный матрикс диафрагмы крысы для проведения <i>in vivo</i> имплантации</b>	<b>22</b>
Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Куевда Е.В., Попова А.В., Хааг Й., Юнгеблут Ф., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Маккиарини П.	
<b>Фармакологическая стратегия регенеративной медицины</b>	<b>23</b>
Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н.	
<b>Активация факторов системы урокиназы и матриксных металлопротеиназ (ММП) в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС)</b>	<b>24</b>
Ефименко А.Ю., Джояшвили Н.А., Калинина Н.И., Акчурин Р.С., Парфенова Е.В.	
<b>Биоразлагаемые пористые матриксы из поли-3-оксипропирата-со-полиэтиленгликоля как подложка для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток</b>	<b>26</b>
Жаркова И.И., Акулина Е.А	
<b>Влияние мутаций в гене ламина А/С на дифференцировочные свойства стромальных клеток жировой ткани</b>	<b>27</b>
Забирник А., Малашичева А., Смолина Н., Дмитриева Р., Костарева А., Омельченко Е.	
<b>Сравнительная характеристика уровней экспрессии иммуномодуляторных молекул в культурах мезенхимальных стромальных клеток из внезародышевых тканей и эндометрия человека</b>	<b>28</b>
Захаров А.В., Метлюк Е.А., Сердюк Я.В., Чулкина М.М., Савилова А.М.	

---

---

<b>Биоинженерные подходы к изучению регенерации хрящевой ткани</b>	<b>29</b>
Зубов Д.А., Васильев Р.Г., Родниченко А.Е., Страфун С.С., Костогрыз О.А., Бруско А.Т., Остапченко Л.И., Курмышов А.В.	
<b>Оценка выживания мезенхимальных стволовых клеток при разных способах введения</b>	<b>30</b>
Калашникова М.В., Брутер А.В., Белявский А.В.	
<b>Внутриклеточная регенерация кальций – транспортирующей системы кардиомиоцитов при ремоделировании миокарда как условие сохранения их функциональной состоятельности</b>	<b>31</b>
Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Егорова М.В., Козлов Б.Н., Попов С.В.	
<b>Радиочувствительность адипоцитов и хондроцитов, полученных из культуры костномозговых мезенхимальных стволовых клеток человека</b>	<b>32</b>
Коноплянников А.Г., Носаченко В.В., Кальсина С.Ш., Конопляников М.А.	
<b>Увеличение эффективности скелетно-мышечного перепрограммирования при помощи транзиторной экспрессии оптимизированных транскрипционных факторов миогенеза</b>	<b>33</b>
Копанцева Е.Е., Белявский, А.В.	
<b>Разработка методов трехмерного культивирования мышечной биомассы</b>	<b>34</b>
Коровина Д.Г., Артамонова М.П.	
<b>Нарушение экспрессии РНК хеликазы Belle приводит к исчезновению герминальных стволовых клеток</b>	<b>35</b>
Котов А., Кибанов М., Оленкина О., Оленина Л.	
<b>Механизмы генерации Ca<sup>2+</sup> ответов на норадреналин мезенхимальными стромальными клетками человека</b>	<b>36</b>
Котова П.Д., Фадеева Ю.И., Тюрин-Кузьмин П.А., Рогачевская О.А., Сысоева В.А., Ткачук В.А., Колесников С.С.	
<b>Циркулирующие ангиогенные факторы, ассоциированные с постинфарктной сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями</b>	<b>37</b>
Кочегура Т.Н., Макаревич П.И., Овчинников А.Г., Жигунова Л.В., Лахова Е.Л., Масенко В.П., Парфенова Е.В., Агеев Ф.Т.	
<b>Циркулирующий уровень эндотелина-1 у больных с систолической сердечной недостаточностью коррелирует со степенью диастолической дисфункции и сахарным диабетом 2 типа.</b>	<b>38</b>
Кочегура Т.Н., Макаревич П.И., Овчинников А.Г., Жигунова Л.В., Лахова Е.Л., Масенко В.П., Парфенова Е.В., Агеев Ф.Т.	
<b>Протокол децеллюляризации легких крысы для создания тканеинженерного каркаса</b>	<b>39</b>
Кувейда Е.В., Губарева Е.А., Сотниченко А.С., Гилевич И.В., Попова А.В., Юнгеблут Ф, Хааг И., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Маккиарини П.	
<b>Анализ динамики изменения морфофункционального состояния интерфазного хроматина мезенхимальных стволовых клеток при действии ФГА и преднизолона</b>	<b>40</b>
Кузнецов А.Б., Юсуфов М.И., Беляков В.К.	
<b>Разработка биологически активных материалов на основе коллагена для замещения тканевых дефектов</b>	<b>42</b>
Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Стручков А.А.	

---

---

<b>Трансплантация ткани аллогенного костного мозга как способ коррекции первичного мужского гипогонадизма</b>	<b>43</b>
Куликова П.А., Машков А.Е., Куликов А.В., Филюшкин Ю.Н., Куликов Д.А.	
<b>Экспрессия транскрипционного фактора NeuroD1 в эпителии языка плодов человека</b>	<b>44</b>
Куртова А.И.	
<b>Влияние модифицирования GDNF на его активность, как индуктора нейральной дифференцировки прогениторных клеток</b>	<b>45</b>
Куст Н.Н., Пантелеев Д.Ю., Рыбалкина Е.Ю., Савченко Е.А., Ревущин А.В., Павлова Г.В.	
<b>Получение и характеристика клеточной модели болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток</b>	<b>46</b>
Лебедева О.С., Некрасов Е.Д., Богомазова А.Н., Честков И.В., Новосадова Е.В., Васина Е.М., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Гривенников И.А.	
<b>Искусственные хромосомы человека для фундаментальных исследований и регенеративной медицины</b>	<b>47</b>
Лисковых М.А., Куприна Н., Ларионов В., Пономарцев С.В., Попова Е., Бадер М., Аленина Н.В., Томилин А.Н.	
<b>Исследование влияния мезенхимных стволовых клеток на формирование метастазов опухоли с использованием люминесцентного биоимиджинга</b>	<b>48</b>
Мелешина А.В., Черкасова Е.И., Ширманова М.В., Клементьева Н.В., Киселева Е.В., Загайнова Е.В.	
<b>Влияние обогащенной среды на развитие прогениторных клеток головного мозга крыс <i>in vitro</i></b>	<b>49</b>
Моргун А.В., Кувачева Н.В., Комлева Ю.К., Салмина А.Б., Хилажева Е.Д.	
<b>Модификация миелоидных клеток аденозином для повышения их регенеративного потенциала при аутологической трансплантации</b>	<b>50</b>
Невская К.В., Юрьева К.С., Иванюк Е.Э., Дзюман А.Н., Иванов В.В., Сазонов А.Э.	
<b>Применение систем TALEN и CRISPR/CAS9 для исправления генетических мутаций в плюрипотентных клетках крыс Brattleboro</b>	<b>51</b>
Немудрый А.А., Стекленева А.Е., Медведев С.П., Васькова Е.А., Иванова Л.Н., Покушалов Е.А., Закиян С.М.	
<b>Новый метод органотипического культивирования <i>in vitro</i> тканей глаза крысы для изучения состояния тканей при патологиях <i>in vivo</i>.</b>	<b>52</b>
Новикова Ю.П., Григорян Э.Н.	
<b>Маркирование процесса нейрогенеза с помощью адресной модификации генома</b>	<b>53</b>
К.Е.Орищенко, А.Г.Мензоров, В.С.Фишман, М. Pasqualetti, М. Bader, N. Alenina, Н.Б.Рубцов, О.Л.Серов	
<b>Молекулярно-генетические аспекты дифференцировки и деления стволовых клеток у рептилий при регенерации</b>	<b>54</b>
Павлова Г.В., Пантелеев Д.Ю.	
<b>Роль макрофагов в молекулярных механизмах межклеточных взаимодействий при клеточной регенерации</b>	<b>55</b>
Панин Л.Е.	

---

---

<b>Анализ роли транскрипционного фактора Prp1 в процессах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши</b>	<b>56</b>
Пеньков Д., Laurent A., Егоров А., Blasi F, Ткачук В.	
<b>Гетерогенные биополимерные имплантаты в тканевой инженерии и регенеративной медицине</b>	<b>57</b>
Перова Н.В., Сургученко В.А., Пономарева А.С., Севастьянов В.И.	
<b>Воспалительное прекондиционирование мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток как способ повышения их эффективности при остром экспериментальном пиелонефрите</b>	<b>58</b>
Плотников Е.Ю., Пулькова Н.В., Певзнер И.Б., Зорова Л.Д., Сухих Г.Т., Зоров Д.Б.	
<b>Влияние содержания кислорода на ММСК в условиях окислительного стресса, вызываемого перекисью водорода</b>	<b>59</b>
Погодина М.В., Буравкова Л.Б.	
<b>Новые подходы к проблеме индукции хондрогенеза в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток</b>	<b>60</b>
Попова А.В., Губарева Е.А., Кувейда Е.В., Сотниченко А.С., Jungebluth P., Lim M., Gustafsson Y., Macchiarelli P.	
<b>Поступление ионов кальция из сателлитных клеток в мышечное волокно: новая функция сателлитных клеток</b>	<b>61</b>
Почаев В.А., Красный А.М., Озернюк Н.Д.	
<b>Изучение особенностей метаболизма 5-аминолевулиновой кислоты в глиомах головного мозга человека.</b>	<b>62</b>
Пустогаров Н.А., Пантелеев Д.Ю., Рыбалкина Е.Ю., Горяинов С.А., Копылов А.М., Коновалов А.Н., Павлова Г.В.	
<b>Влияние клеток Сертоли на дифференцировку сперматогоний хряка <i>in vitro</i></b>	<b>63</b>
Савченкова И.П.	
<b>PI3-киназный путь передачи сигнала участвует в регуляции миграции и пролиферации NIH-3T3 фибробластов по редокс-зависимому механизму</b>	<b>64</b>
Сагарадзе Г.Д., Ждановская Н.Д., Тюрин-Кузьмин П.А., Морозов Я.И., Сухова А.А., Воротников А.В.	
<b>Эффект одновременной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на индукцию ангиогенеза <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i></b>	<b>65</b>
Салафутдинов И.И., Катина М.Н., Черенкова Е.Е., Ризванов А.А.	
<b>Секреторная активность генетически модифицированных стволовых клеток человека</b>	<b>66</b>
Салафутдинов И.И., Соловьева В.В., Черенкова Е.Е., Мартынова Е.В., Хайбуллина С.Ф., Ризванов А.А.	
<b>Морфофункциональный анализ действия аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на саркому M-1</b>	<b>67</b>
Севаньяева Л.Е., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Бандурко Л.Н., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш.	
<b>Некоторые биологические характеристики и эффекты лизата тромбоцитов доноров как ростовой добавки для безопасного культивирования клеток</b>	<b>68</b>
Сергеева Н.С., Васильев А.В., Шанский Я.Д., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Кувшинова Е.А.	

---



---

<b>Пептиды, полученные из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, улучшают гистологическую картину при острой печеночной недостаточности</b>	<b>69</b>
Склифас А.Н., Темнов А.А., Вагабов А.В., Лебедев М.П., Рогов К.А.	
<b>Система для направленного внесения мутаций экспансии тринуклеотидных повторов</b>	<b>70</b>
Сорокин М.А., Медведев С.П., Покушалов Е.А., Закиян С.М.	
<b>Патоморфологическая характеристика децеллюляризованного каркаса сердца крысы</b>	<b>71</b>
Сотниченко А.С., Губарева Е.А., Гилевич И.В., Куевда, Е.В., Попова А.В., Хаар Й., Юнгеблут Ф., Крашенинников С.В., Григорьев Т.Е., Чвалун С.Н., Маккиарини П.	
<b>Паттерн транскрипции белок-кодирующих и регуляторных РНК в плюрипотентных клетках крысы</b>	<b>72</b>
Стекленева А.Е., Медведев С.П., Васькова Е.А., Немудрый А.А., Елисафенко Е.А., Евшин И.С., Шарипов Р.Н., Сайфутдинова С.Г., Кизилова Е.А., Железова А.И., Иванова Л.Н., Покушалов Е.А., Закиян С.М.	
<b>Изучение темновой цитотоксичности нанокompозитных фотосенсибилизаторов на мультипотентных мезенхимных стромальных клетках</b>	<b>73</b>
Ударцева О.О., Лобанов А.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.	
<b>Субпопуляция гетерогенной культуры МСК, отвечающая по механизму кальций-индуцированного выброса кальция</b>	<b>74</b>
Фадеева Ю.И., Тюрин-Кузьмин П.А., Сысоева В.Ю., Котова П.Д., Рогачевская О.А., Колесников С.С., Ткачук В.А.	
<b>Морфология кожи больных системной склеродермией при трансплантации аутологичных клеток костного мозга</b>	<b>75</b>
Федотовских Г. В., Аскарлов М.Б., Шаймарданова Г. М., Сохарев Е.Ю., Старикова Т.Г, Жусупова А.А.	
<b>Обратимость старения стволовых клеток и причина роста числа асимметричных делений в интерфолликулярном эпидермисе</b>	<b>76</b>
Халявкин А.В.	
<b>Коллагеновый состав стромы органа человека в пренатальном онтогенезе создает основу для создания биоматрикса при развитии органа из стволовых клеток</b>	<b>77</b>
Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю.Г., Барановский А.Г.	
<b>Характеристики стромальных клеток-предшественников в костном мозге больных острым лимфобластным лейкозом до и после проведения аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток</b>	<b>78</b>
Шипунова И.Н., Петинати Н.А., Сац Н.В., Бигильдеев А.Е., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.	
<b>Действие мезенхимальных стволовых клеток на выживаемость крыс и репаративные процессы в легких после гамма-облучения</b>	<b>79</b>
Яковлева Н.Д., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Севаньяева Л.Е., Бандурко Л.Н., Фомина Н.К., Токарев О.Ю., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Лепехина Л.А.	
<b>Молекулярные и клеточные механизмы миграции и хоуминга мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных внутривенно</b>	<b>80</b>
Ярыгин К.Н., Холоденко И.В.	

---

# Глюкагон-продуцирующие клетки островков могут быть источником восстановления поджелудочной железы после повреждения

Абдулхакова А.Р., Трондин А.А., Певнев Г.О., Мавликеев М.О., Галябиева А.Р., Гумерова А.А., Абдулхаков С.Р., Киясов А.П.

*Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия  
Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

Предполагается, что регенерация ткани поджелудочной железы может происходить за счет различных источников, в том числе ацинарных, островковых или протоковых клеток. Одной из моделей для изучения ее регенерации является повреждение органа на фоне медь-дефицитной диеты.

**Материалы и методы.** Эксперименты проводили на 24 белых лабораторных крысах-самцах линии Вистар весом 80-100 г. Животные получали медь-дефицитную диету (MP Biomedicals, США) с добавлением медь-связывающего нетоксичного вещества - триэтилентетрамина тетрагидрохлорида (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd, Japan) в конечной концентрации 0,6 % и имели свободный доступ к воде в течение 8 недель, а затем были переведены на обычный сбалансированный корм для грызунов в течение 8 недель.

Группы из 3 животных были умерщвлены на сроках 2, 4, 6, 8 недель кормления и 2, 4, 6, 8 недель отмены медь-дефицитной диеты. Гистологические срезы поджелудочной железы окрашивались иммуногистохимическим методом с использованием антител против инсулина и глюкагона.

**Результаты.** Через 4 недели кормления медь-дефицитной диетой отмечались признаки нарушения структуры ацинарной ткани поджелудочной железы, через 6 и 8 недель кормления на фоне практически полного разрушения ацинусов сохранялись немногочисленные протоковые структуры и островки поджелудочной железы; аналогичная картина сохранялась через 2 и 4 недели после возвращения на стандартный рацион питания. Частичное восстановление ацинарной ткани поджелудочной железы наблюдалось на сроках 6 и 8 недель отмены медь-дефицитного корма.

В контрольной группе животных глюкагон-позитивные клетки располагались по периферии островков узким ободком, инсулин-позитивные клетки занимали большую центральную часть островка.

При окрашивании антителами против глюкагона на начальных этапах кормления медь-дефицитной диетой (2-4 недели) наряду с позитивно окрашенными по периферии выявлялись окрашенные полностью островки, а также отдельные глюкагон-позитивные клетки. На более поздних этапах кормления (6-8 недель), а также на ранних сроках отмены медь-дефицитной диеты (2-4 недели отмены) обнаруживались мелкие островки, полностью окрашенные антителами к глюкагону, а также крупные островки с более интенсивно окрашенными клетками по периферии и менее интенсивно окрашенными - в центральной части островка. Через 6 и 8 недель отмены медь-дефицитной диеты наблюдалось частичное восстановление ацинарной ткани вокруг сохранившихся/сформированных островков поджелудочной железы.

При окрашивании антителами против инсулина на всех сроках эксперимента окрашивались только клетки центральной части островков.

**Выводы.** Полученные результаты позволяют предположить, что островки, в частности, глюкагон-продуцирующие клетки могут быть источником восстановления ацинарной ткани поджелудочной железы.

# **Влияние мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика на лимфоциты, активированные аллергеном**

Айзенштадт А.А.<sup>1</sup>, Супильникова О.В.<sup>1</sup>, Смолянинов А.Б.<sup>1</sup>, Самойлович М.П.<sup>2</sup>, Климович В.Б.<sup>2</sup>

1. ООО "Покровский банк стволовых клеток", Санкт-Петербург, Россия

2. Российский научный центр радиологии и хирургических технологий, Санкт-Петербург, Россия

Известно, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) способны оказывать супрессивное действие на функциональную активность Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, дендритных клеток и естественных киллеров (NK). Эти свойства позволяют рассматривать МСК в качестве возможного средства клеточной терапии иммунопатологических состояний, в том числе аллергических реакций. Характер действия МСК на лимфоидные клетки, участвующие в аллергических реакциях, остается мало известным. Одним из наиболее перспективных источников МСК для клинического применения является пупочный канатик (ПК), поскольку МСК ПК характеризуются более высоким пролиферативным потенциалом по сравнению с МСК костного мозга. Задача работы состояла в исследовании влияния аллогенных МСК ПК на стимулированные аллергенами лимфоциты пациентов, страдающих аллергией.

МСК были получены из пупочного канатика при неосложненных родах (при наличии подписанного информированного согласия) в соответствии с принятыми протоколами. Лимфоциты получали из крови пациентов с пищевой моноаллергией, лекарственной моноаллергией, аллергией на пыльцу растений и бытовые аллергены – всего в исследовании участвовало 16 доноров. На градиенте фикола выделяли лейкоцитарную фракцию. Клетки суспендировали в концентрации 5 млн/мл в ростовой среде RPMI с 10% фетальной бычьей сыворотки, добавляли раствор аллергена и вносили в лунки 6-ти луночного планшета, содержащего культуру МСК в состоянии 70% конфлюентности. Сокультивирование клеток в присутствии аллергена проводили в течение 3 суток. Контролями служили лейкоциты тех же пациентов, интактные, или инкубированные с аллергеном в отсутствие МСК. Поверхностные лимфоцитарные маркеры выявляли с помощью меченных флуорохромами антител на проточном цитофлуориметре FC500 Beckman Coulter. Содержание IgE, IL10 и IL4 в культуральной жидкости определяли методом иммуноферментного анализа.

При инкубации лейкоцитов с аллергенами процентное содержание популяций В- (CD19+) и Т- (CD3+) лимфоцитов, а также Т-хелперов (CD3+, CD4+) и Т-цитотоксических клеток (CD3+, CD8+) соответствовало контрольным значениям и существенно не изменялось в присутствии МСК. В то же время культивирование лейкоцитов с аллергеном увеличивало фракцию активированных Т-лимфоцитов (CD45+, CD3+, HLA-DR+), которая при этом достигала 13-19%. При сокультивировании стимулированных аллергеном лейкоцитов с МСК количество активированных Т-лимфоцитов не превышало 5-8%, что соответствовало значениям, характерным для лимфоцитов, не активированных аллергеном. Кроме того, сокультивирование с МСК приводило к увеличению содержания Т регуляторных клеток (CD4+, CD25+, CD127dim). Присутствие МСК при инкубации лейкоцитов с аллергеном вызывало повышение секреции противовоспалительного цитокина IL-10, снижение продукции провоспалительного цитокина IL4 и эффекторной молекулы аллергического иммунного ответа - IgE. Описанную систему можно рассматривать как модель для изучения влияния МСК на эффекторное звено аллергических реакций.

# Неканонические нейральные стволовые / прогениторные клетки человека

Александрова М.А., Кузнецова А.В., Ржанова Л.А.

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

Интенсивные исследования дифференцировки и пластичности стволовых клеток (эмбриональных и тканеспецифических), а так же создание индуцированных плюрипотентных клеток из соматических клеток, повлекли за собой новую волну интереса к проблемам де- и трансдифференцировки. В области нейральных стволовых клеток изменились представление о типах клеток, способных к нейрогенезу благодаря обнаружению в сетчатке глаза, которая, как весь мозг развивается из нейроэпителиальных клеток нервной трубки, клеток - подобных нейральным стволовым/прогениторным клеткам мозга. Такие клетки были выявлены в глазу млекопитающих и человека в цилиарной области, в ретиальном пигментном эпителии (РПЭ) и нейральной сетчатке. Среди этих клеток особый интерес вызывают клетки РПЭ, которые способны к трансдифференцировке, допускающей восстановление сетчатки у ряда низших позвоночных в течение всей жизни и у млекопитающих в эмбриональном периоде. В тоже время, у взрослых людей клетки РПЭ могут проявлять высокую молекулярно-генетическую и поведенческую пластичность, которая, собственно и является причиной разнообразных патологий зрения. Мы предположили, что клетки РПЭ гетерогенны и часть их обладающая стволовыми мультипотентными свойствами способна в определенных условиях к трансдифференцировке (в нейроны и глию), подобно стволовым клеткам взрослого мозга, которые являются своеобразными астроцитами. Фундаментальный и практический интерес представляет направление клеток в нейрональную дифференцировку. С одной стороны в этом содержится перспектива реконструкции поврежденной сетчатки *in situ*, с другой, клетки РПЭ могут оказаться источником аутологичных нейральных прогениторных клеток для получения специализированных нейронов *in vitro* с целью восстановления поврежденных тканей головного мозга и сетчатки.

На разработанной системе культивирования РПЭ *in vitro*, которая может служить для фундаментальных и медицинских исследований, изучали механизмы трансдифференцировки дефинитивных клеток РПЭ взрослого человека. Работа показала, что *in vitro* в РПЭ возникают процессы, подобные трансдифференцировке, при которых клетки пролиферируют, мигрируют, депигментируются, экспрессируют нехарактерные маркеры и дифференцируются в другие типы клеток. Часть популяции не только теряет специфический маркер дефинитивных клеток (RPE65), но и экспрессирует гены-маркеры стволовых клеток Oct4 (POU5F1), Nanog, Prox1, Musashi 1 и Pax6. Многие клетки дифференцируются по нейральному пути и экспрессирует гены Musashi и Pax6 (специфичные для НСПК), ген  $\beta$ III-tubulin (маркер нейробластов), и белки: нестин, виментин (маркеры НСПК) и маркеры дифференцированных нейронов – тирозингидроксилазы и нейрофиламентов 68 и 200 kDa. Полученные популяции клеток, для изучения нейропротекторного потенциала, были трансплантированы в мозг крыс подвергнутых острой гипоксии. Количественный морфологический анализ показал, что клетки РПЭ глаза взрослого человека, трансдифференцированные *in vitro* в нейральном направлении в значительной степени предохраняют нейроны коры мозга реципиентов от разветвления процессов дегенерации.

Полученные данные свидетельствуют о том, что РПЭ глаза взрослого человека, состоящий состоит из клеток нейрального генеза, *in vitro* обнаруживает гетерогенность клеток, проявляющих мультипотентность с нейральным потенциалом.

# **Влияние белков внеклеточного матрикса на способность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга к дифференцировкам в остеогенном и адипогенном направлениях**

Александрова С. А., Воронкина И.В., Пинаев Г. П.

*ФГБУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

В настоящее время активно ведется поиск материалов для использования в тканевой инженерии. Одним из перспективных направлений является покрытие материала-носителя белками, входящими в состав внеклеточного матрикса (ВКМ), взаимодействие с которыми может изменить биологическую активность трансплантируемых клеток. В настоящее время данные о влиянии различных компонентов внеклеточного матрикса на дифференцировочные способности стволовых клеток довольно противоречивы. Целью настоящей работы являлось исследование влияния мажорных белков внеклеточного матрикса на направленную дифференцировку мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК) костного мозга.

Выделенные из костного мозга бедренных костей новорожденного кролика МСК 4-5 пассажа культивирования помещали на иммобилизованные на субстрате белки ВКМ (фибронектин, ламинин 2/4, коллагены I и IV типов) и проводили индукцию дифференцировки в остеогенном или адипогенном направлениях. Результат остеогенной дифференцировки оценивали по активности щелочной фосфатазы и наличию нерастворимых солей кальция (окраска ализариновым красным), адипогенной дифференцировки - по появлению в клетках липидных капель (окраска жировым красным). Исследование показало, что изучаемые белки не препятствовали дифференцировке МСК. При культивировании МСК на субстратах, покрытых фибронектином и ламинином 2/4, под влиянием индукционных сред наблюдалось более интенсивное, чем в контроле, проявление признаков дифференцировки в остеогенном и адипогенном направлениях. Коллаген I типа не влиял на интенсивность дифференцировки МСК в остеогенном направлении, однако больше других белков способствовал дифференцировке в адипогенном направлении. Коллаген IV типа, наоборот, лучше других белков стимулировал выработку клетками кальция, но накопление липидов при его использовании было выражено в наименьшей степени. Можно заключить, что белки ВКМ оказывают различное влияние на способность к дифференцировкам МСК в остеогенном и адипогенном направлениях, что следует учитывать при использовании их в тканевой инженерии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 13-04-12027-офи «Исследование формирования тканеподобных структур *in vitro* для регенеративной терапии и реконструктивной хирургии».

## **Сравнение параметров роста МСК мышцы в условиях 2D и 3D культивирования**

---

Андреева Н.В.<sup>1</sup>, Бонарцев А.П.<sup>2</sup>, Жаркова И.И.<sup>2</sup>, Белявский А.В.<sup>1</sup>

1. ФГБУН Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

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

---

Параметры роста мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и число популяционных делений, проходимых культурой, зависит от многих условий, в том числе среды культивирования, плотности посева, субстрата, на котором растут клетки, а также газового состава среды. В частности, МСК мышцы, в отличие от МСК человека и некоторых других животных, крайне чувствительны к кислородному стрессу и подвергаются ускоренному репликативному старению при культивировании в стандартных условиях, то есть при нормоксии. Для длительного культивирования МСК мышцы используют поэтому условия пониженного содержания кислорода.

В данной работе проводилось сравнение параметров роста МСК жировой ткани мышцы при длительном культивировании на культуральном пластике (2D) и на полигидроксibuтиратной матриксе (3D). Культивацию МСК проводили в условиях нормоксии и гипоксии (5% O<sub>2</sub>), опыты проводились в течение двух месяцев.

Полученные данные показали, что при культивировании МСК мышцы в условиях гипоксии разница в параметрах роста клеток в 2D и 3D условиях невелика, хотя клетки на матриксе росли немного быстрее и прошли больше популяционных делений (ПД), чем клетки на пластике (94 и 85 ПД, соответственно). При этом трансформации и иммортализации клеточных культур в обоих случаях не происходило. В то же время, принципиальная разница в поведении клеток в 2D и 3D условиях наблюдалась при нормоксии. В то время как на пластике при нормоксии МСК прошли всего 26 ПД (5 пассажей), их поведение на матриксе практически не отличалось от такового при гипоксии, и клетки прошли на матриксе при нормоксии 88 ПД (18 пассажей).

Из полученных данных следует, что трехмерный матрикс на основе полигидроксibuтирата является подходящим субстратом для долговременного культивирования МСК. Более того, полигидроксibuтиратный матрикс, по-видимому, способен защищать МСК мышцы от действия кислородного стресса.

# **Роль рецептора урокиназы (uPAR) и щелевых контактов в механизмах ангиогенного действия мезенхимальных стромальных клеток на модели со-культивирования с эндотелиальными клетками человека *in vitro***

Аниол Н.В., Воротников А.В., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.

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

Мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (МСК-ЖТ) являются перспективным инструментом клеточной терапии заболеваний ишемического генеза. Было показано, что МСК обладают существенной ангиогенной активностью, однако механизм их ангиогенного действия до конца не выяснен. Мезанхимальные клетки в основном обнаруживаются периваскулярно и являются компонентами сосудистой стенки. Предполагается, что контактное взаимодействие мезенхимальных клеток с эндотелиальными клетками играет ключевую роль в процессе ангиогенеза.

Взаимодействие МСК-ЖТ с эндотелиальными клетками вены пуповины человека (ЭК) было исследовано в условиях смешанной культуры при контактном и бесконтактном (в трансвеллах) со-культивировании МСК с ЭК. Мы впервые обнаружили, что МСК-ЖТ стимулируют образование капилляро-подобных структур эндотелиальными клетками при со-культивировании клеток на пластике, однако данные структуры формировались только при контактном со-культивировании. Экспрессия рецептора урокиназы (uPAR), одного из ключевых регуляторов ангиогенеза, значительно возрастала на поверхности ЭК при контактном взаимодействии с МСК-ЖТ. Добавление нейтрализующих uPAR антител приводило к дозо-зависимому ингибированию образования капилляро-подобных структур. Известно, что в процессе эмбриогенеза и ремоделирования тканей межклеточные взаимодействия играют ключевую роль в регуляции поведения клеток, определяют направление клеточной дифференцировки, пролиферацию и миграцию. Мы предположили, что щелевые контакты могут играть важную роль в процессе взаимодействия МСК-ЖТ с ЭК. Методом иммуноцитохимии было выявлено, что коннексин 43 экспрессируется на поверхности мезенхимальных и эндотелиальных клеток. Кроме того, ингибирование щелевых контактов с использованием неспецифических химических ингибиторов коннексонов существенно подавляло формирование капилляро-подобных структур эндотелием, однако не влияло на уровень экспрессии uPAR. Таким образом, непосредственное межклеточное взаимодействие между МСК-ЖТ и ЭК необходимо для стимулирования образования капилляро-подобных структур эндотелием, и щелевые контакты, по-видимому, играют важную роль в процессе ангиогенного действия МСК-ЖТ. Активация экспрессии uPAR на поверхности ЭК может способствовать миграции ЭК и формированию вытянутых сосудисто-подобных структур, и также принимает важное участие в процессе капиллярогенеза. Однако изучение механизмов активации экспрессии uPAR и его участия в ангиогенном действии МСК-ЖТ на модели со-культивирования с ЭК являются целью наших дальнейших исследований.

# Терапевтический потенциал аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в комплексном лечении переломов проксимального отдела бедренной кости

В.В. Багаева,<sup>2</sup> А.В. Малько,<sup>1</sup> А.Б. Смолянинов,<sup>2</sup> А.М. Савинцев<sup>1</sup>

1. СПбГБУЗ «Городская Покровская больница», Санкт-Петербург, Россия

2. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

**Цель.** Стимуляция процессов репаративной регенерации при переломах проксимального отдела бедренной кости (тип 31-A2) путем введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в зону перелома в сочетании с интрамедуллярным остеосинтезом.

**Материалы и методы.** Под наблюдением находилось трое больных женского пола с переломами проксимального отдела бедренной кости. Средний возраст пациентов составил 85 лет. Показанием к применению аутологичных мезенхимальных стволовых клеток явилось усиление процессов репаративной регенерации в зоне перелома.

**Результаты и обсуждение.** Пациентам выполнялся интрамедуллярный малоинвазивный остеосинтез бедренной кости конструкциями PFN и PFN-A по стандартной методике. Во время операции производился забор жировой ткани пациента из имеющихся разрезов в количестве 1-2 кубических сантиметров. Жировая ткань использовалась для культивирования мезенхимальных стволовых клеток. В послеоперационном периоде проводилась ранняя активизация пациентов, разрешалась ходьба с опорой на прооперированную конечность. Через 14 суток после операции в зону перелома инъекционно вводилось 10 млн культивированных стволовых клеток жировой ткани как в сочетании с введением аллогенной обогащенной тромбоцитами плазмы так и без нее. У всех пациентов на 10 неделе после операции отмечены рентгенологические признаки полной консолидации перелома, хорошая функция конечности.

**Выводы.** Введение в зону перелома проксимального отдела бедренной кости мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в сочетании с интрамедуллярным остеосинтезом способствует стимуляции процессов репаративной регенерации в зоне повреждения, что приводит к укорочению сроков консолидации перелома и улучшению результатов лечения.



# Влияние интерлейкина-1 бета на экспрессию генов-маркеров дифференцировки мультипотентных мезенхимных стромальных клеток

Бигильдеев А.Е., Зезина Е.А., Шипунова И.Н., Дризе Н.И.

ФГБУ "Гематологический научный центр" Минздрава России, Москва, Россия

Интерлейкин-1 бета (ИЛ-1) является одним из ключевых регуляторов воспаления. Однако были обнаружены новые функции ИЛ-1, не связанные напрямую с воспалением. Помимо кроветворных клеток, ИЛ-1 экспрессируется мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК) при механическом стрессе. Установлено, что ИЛ-1 стимулирует пролиферацию фибробластов кожи. Недавно было показано, что ИЛ-1 стимулирует дифференцировку ММСК в остеогенном направлении в присутствии индукторов. Нами было обнаружено, что культивирование ММСК в присутствии 4 пг/мл ИЛ-1 приводит к увеличению суммарной клеточной продукции (в 1,5 -1,6 раза, начиная с 1 пассажа, к 5 пассажу увеличение становится статистически значимым).

Ввиду данных о том, что в определенных условиях ИЛ-1 стимулирует дифференцировку ММСК, целью данной работы было установить, стимулирует ли ИЛ-1 основные мезенхимальные дифференцировки в культуре ММСК без добавления соответствующих специфических индукторов и субстратов.

Костный мозг был получен от 19 доноров (в возрасте от 20 до 56 лет /медиана возраста 32 года/, 9 женщин, 10 мужчин) после информированного согласия во время эксфузии для аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток в отделении Высокодозной химиотерапии и трансплантации костного мозга ФГБУ ГНЦ МЗ России. ММСК получали путем посадки  $3 \times 10^6$  мононуклеаров из костного мозга на флакон с площадью дна  $25 \text{ см}^2$  в среде  $\alpha\text{MEM}$  с 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Клетки культивировали при  $37^\circ\text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . Рекombинантный человеческий ИЛ-1 добавляли 2 раза в неделю при смене среды в концентрации 4 пг/мл. Концентрация была выбрана на основании предварительных экспериментов как наиболее оптимальная для увеличения клеточной продукции. Все ММСК культивировали в течение 5 пассажей. На 1-3 и 5 пассажах часть клеток лизировали и выделяли тотальную РНК с помощью стандартной методики с гуанидин изотиоцианатом. В качестве генов-маркеров дифференцировок использовали SPP1 (костная), PPARG (жировая), SOX9 (хрящевая дифференцировка). Экспрессию генов оценивали с помощью ПЦР в режиме реального времени с предшествующей обратной транскрипцией.

Было показано, что по мере культивирования ММСК в стандартных условиях не происходит значимого увеличения экспрессии исследуемых генов. SPP1 очень слабо экспрессирован на протяжении всего времени культивирования. Экспрессия гена PPARG увеличивается в  $1,6 \pm 0,4$  раз к 3 пассажу (по отношению к 1 пассажу) и в  $2,8 \pm 2,0$  раз к 5 пассажу. Экспрессия гена SOX9 увеличивается в  $1,9 \pm 0,5$  раз к 3 пассажу и в  $0,9 \pm 0,2$  раз к 5 пассажу. Анализ экспрессии дифференцировочных генов показал, что добавление 4 пг/мл ИЛ-1 к культуре ММСК не приводит к изменению относительного уровня их экспрессии. Не происходит активации экспрессии SPP1. Экспрессия гена PPARG увеличивается в  $1,1 \pm 0,4$  раз к 3 пассажу (по отношению к 1 пассажу) и в  $1,5 \pm 0,5$  раз к 5 пассажу. Экспрессия гена SOX9 увеличивается в  $1,9 \pm 0,6$  раз к 3 пассажу и в  $1,2 \pm 0,4$  раз к 5 пассажу. В среднем по всем пассажам при добавлении ИЛ-1 к ММСК происходит незначительное увеличение экспрессии гена SOX9 в  $1,7 \pm 0,4$  раза, а экспрессия генов PPARG и SPP1 не изменяется.

Из полученных результатов можно заключить, что культивирование ММСК с добавлением 4 пг/мл рекombинантного человеческого ИЛ-1 в отсутствие специфических индукторов мезенхимальных дифференцировок приводит к достоверному увеличению суммарной клеточной продукции, что не спороводжается спонтанной дифференцировкой клеток в таких культурах. Таким образом, ИЛ-1 можно рассматривать в качестве стимулятора роста ММСК, что является важным для применения в клеточной терапии и регенеративной медицине, где требуется получение больших количеств аутологических ММСК.

## **Влияние аллогенных ФГА-активированных мононуклеаров на ММСК при пониженной концентрации кислорода**

Бобылёва П.И., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

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

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК) рассматриваются как перспективный инструмент регенеративной медицины, с возможностью использовать их, в частности, для аллотрансплантации в терапевтических целях. Исходя из этого, одной из наиболее значимых характеристик ММСК являются их иммуносупрессивные свойства, клеточные и молекулярные механизмы которых в настоящее время активно изучаются. На текущий момент менее проработан вопрос о том, как взаимодействие с аллогенными иммунными клетками влияет на свойства самих ММСК. Кроме того, недостаточно внимания уделяется такому важному аспекту, как условия локального микроокружения, в частности, парциальному давлению O<sub>2</sub>, в зависимости от которого могут изменяться пролиферативные и дифференцировочные потенции ММСК. В данной работе изучали, как сокультивирование с ФГА-активированными мононуклеарами периферической крови (МНК) влияет на жизнеспособность и состояние внутриклеточных органелл ММСК.

ММСК, выделенные из жировой ткани, в течение 72 ч сокультивировали с ФГА-активированными МНК при 20% и 5% O<sub>2</sub> в среде. Цитотоксический эффект оценивали цитофлуориметрическим методом (Epics XL, Beckman Coulter, США) по уменьшению доли живых ММСК, определяли соотношение некротического и апоптотического путей гибели (окрашивание аннексин V-FITC - иодид пропидия), состояние внутриклеточных органелл с использованием мито- и лизотрекерров, продукцию АФК (зонд H<sub>2</sub>DCFDA).

ФГА-стимулированные МНК не оказывали выраженного цитотоксического действия на ММСК при сокультивировании, хотя наблюдалось увеличение количества клеток в стадии позднего апоптоза. При 20% и 5% O<sub>2</sub> происходило повышение продукции АФК в среднем от 2 до 6,5 раз по сравнению с монокультурой ММСК. В некоторых случаях доля ММСК, продуцирующих АФК, при 5% O<sub>2</sub> увеличивалась в меньшей степени, чем при 20%. Лизосомальная активность ММСК в присутствии ФГА-стимулированных МНК в среднем увеличивалась в 1,5 раза, этот эффект не зависел от уровня O<sub>2</sub>. Изменения активности митохондрий при сокультивировании не наблюдалось.

Таким образом, взаимодействие с ФГА-активированными МНК приводит к изменению функционального состояния ММСК. Можно предположить, что эффекты, обнаруженные при близкой к тканевой (5%) концентрации кислорода, могут быть объяснены как большей устойчивостью ММСК к действию провоспалительных медиаторов ФГА-МНК, так и снижением продукции этих медиаторов самими иммунными клетками.

Работа выполнена при поддержке Программы №7 Президиума РАН

## Влияние G-CSF на функциональные свойства эндотелиальных прогениторных клеток пациентов с хронической сердечной недостаточностью

Бондаренко Н.А.<sup>1,2</sup>, Лыков А.П.<sup>1,2</sup>, Ким И.И.<sup>1,2</sup>, Повещенко О.В.<sup>1,2</sup>, Повещенко А.Ф.<sup>1,2</sup>, Покушалов Е.А.<sup>2</sup>, Романов А.Б.<sup>2</sup>, Караськов А.М.<sup>2</sup>, Коненков В.И.<sup>1,2</sup>

1. ФГБУ Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск, Россия
2. Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина Минздрава России, Новосибирск, Россия

Эндотелиальные прогениторные клетки (ЭПК) играют важную роль в неоваскуляризации тканей взрослого организма, что обусловлено их способностью дифференцироваться в эндотелиальные клетки, участвуя в формировании новых сосудов, а также способностью продуцировать различные ростовые факторы и цитокины, стимулирующие васкуло- и ангиогенез.

**Целью** исследования является изучение эффективности мобилизации и цитокинпродуцирующей активности ЭПК введением препарата G-CSF у пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН).

**Материалы и методы.** В исследование включено 30 пациентов с III-IV функциональным классом ХСН (NYHA). Фенотипирование ЭПК проводили с помощью проточного цитометра FACSCantoll. Культура ЭПК получена из мононуклеаров (МНК) мобилизованных введением G-CSF на обработанном фибронектином пластике. Уровень продукции цитокинов изучали в кондиционных средах с помощью твердофазного иммуноферментного анализа.

**Результаты.** Показано, что мобилизация G-CSF приводит к достоверному увеличению количества циркулирующих ЭПК различной степени зрелости в периферической крови у пациентов с ХСН. Так возрастает количество ранних ЭПК (в дифференцировочном отношении) с фенотипом - CD133+/CD34- (с 1,65x10<sup>6</sup>/л до 15,4x10<sup>6</sup>/л), CD34+/CD133+ (с 0,23x10<sup>6</sup>/л до 0,96x10<sup>6</sup>/л), CD34+ (с 0,238x10<sup>6</sup>/л до 18,7x10<sup>6</sup>/л); зрелых ЭПК с фенотипом CD34+/VEGFR2+ (с 0,205x10<sup>6</sup>/л до 3,95x10<sup>6</sup>/л), CD34+/CD31+ (с 1,7x10<sup>6</sup>/л до 8,4x10<sup>6</sup>/л); циркулирующих зрелых эндотелиальных клеток - VEGFR2+/CD34- (с 5,25x10<sup>6</sup>/л до 43,4x10<sup>6</sup>/л), CD31+/CD34- (с 221,4x10<sup>6</sup>/л до 543,0x10<sup>6</sup>/л) и ЭПК моноцитарного происхождения - CD14+/VEGFR2+ (с 9,8x10<sup>6</sup>/л до 84,8x10<sup>6</sup>/л). Установлена высокая сопряженность между количеством различных популяций ЭПК и продукцией проангиогенных цитокинов в культуре МНК. Так, ЭПК с фенотипом CD133+/34- сопряжены с уровнем продукции TNF- $\alpha$ , ЭПК с фенотипом CD34+/VEGFR2- и CD34+/VEGFR2+ с уровнями продукции IL-18, также между количеством ЭПК с фенотипом VEGFR2+/ CD34- имеется сопряженность с уровнем продукции Eро, ЭПК с фенотипом CD34+/31+ и уровнем продукции IL-10, ЭПК с фенотипом CD31+/34- с уровнем продукции VEGF. Выявлено, что «ранние» ЭПК при культивировании на фибронектине (8 сут) продуцируют широкий спектр цитокинов и ростовых факторов, таких как TNF- $\alpha$  (10 пг/мл), IL-10, (668,7 пг/мл), IL-18 (612 пг/мл), IL-8 (4442 пг/мл), Eро (132,5 мМЕ), G-CSF (10 пг/мл), VEGF (536,7 пг/мл). Для «поздних» ЭПК (16 сут) отмечено снижение продукции IL-10 (320 пг/мл), IL-18 (95 пг/мл), IL-8 (1040 пг/мл), Eро (5 мМЕ), VEGF (255 пг/мл).

**Выводы.** Таким образом, МНК периферической крови после мобилизации G-CSF у пациентов с ХСН содержат гетерогенную популяцию ЭПК, характеризующихся высокой цитокинпродуцирующей активностью и могут использоваться для стимуляции репарации и регенерации ишемизированной ткани.

## **Иммунорегуляция и паракринная активация мезенхимальных стромальных клеток: две стороны одного процесса**

Буравкова Л.Б., Андреева Е.Р.

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

Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) являются важнейшим компонентом тканевого гомеостаза, а также процессов физиологического ремоделирования тканей и их восстановления после повреждения. В настоящее время считается, что МСК могут стать одним из важных инструментов восстановительной медицины. Это связано с их способностью к продукции биологически активных молекул и потенциальной возможностью к дифференцировке в клетки целого ряда тканей, в первую очередь, мезенхимального происхождения. В дополнение к этим свойствам, МСК обладают иммуносупрессивным потенциалом, что может обеспечить подавление иммунного ответа при их аллогенном использовании. Эти клетки являются иммунопровоспалительными факторами секреции растворимых факторов и прямых контактов «клетка-клетка». Молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе иммуносупрессивного действия ММСК в настоящее время активно изучаются [English and Mahon, 2011; Gebler et al., 2012; Буравкова и Андреева, 2010; Иванюк и др., 2011; Рубцов и др., 2012]. В этой связи все больший интерес привлекает феномен провоспалительной активации МСК, результатом чего, по всей видимости, и является индукция их иммуносупрессивного действия. Однако, изменения, происходящие с МСК при провоспалительной активации изучены не столь подробно, как иммуномодуляторной активности МСК. В нашей лаборатории успешно проводятся работы, направленные на исследование изменений, происходящих с МСК при взаимодействии с активированными иммунными клетками. При контакте с ФГА-стимулированными МНК происходило снижение способности МСК к пролиферации и дифференцировке в остео- и адипо- направлениях. При этом не обнаружено выраженного цитотоксического эффекта. Взаимодействие с ФГА-МНК приводило к увеличению доли МСК, содержащих АФК, что в некоторых случаях сопровождалось снижением трансмембранного потенциала митохондрий и активацией лизосомального компартмента. По-видимому, можно говорить о существовании «обратной связи» между стромальными и иммунными клетками, регулирующей выраженность иммуносупрессивного эффекта. Предполагается, что для проявления иммуносупрессии ММСК необходим определенный уровень провоспалительных медиаторов, характерный для иммунного ответа, после чего ММСК начинают синтезировать медиаторы, которые не продуцируются ими в неактивированном состоянии, и увеличивать экспрессию конститутивных противовоспалительных метаболитов. По-видимому, провоспалительная индукция не влияет на «мезенхимность» МСК, но потенцирует их иммуносупрессивную активность.

Таким образом, иммуномодуляторный потенциал МСК, представляет, по-видимому, одну из интегральных частей общей реакции организма на «повреждение», в котором необходимо рассматривать взаимодействие МСК-иммунные клетки как двунаправленный процесс, опосредованный непосредственными контактами «клетка-клетка», паракринными медиаторами, а также локальными факторами микроокружения различных тканевых ниш.

Работа выполнена при поддержке Программы №7 Президиума РАН и гранта РФФИ 13-04-00791.

# Влияние даларгина на пролиферацию культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и дермальных фибробластов и линии клеток саркомы человека

Васильев А.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В., Вихрова Е.Б., Гольдштейн Д.В., Большакова Г.Б.

ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва, Россия  
ФГБУ «НИИ морфологии человека» РАМН, Москва, Россия

**Введение.** В многочисленных исследованиях установлено положительное влияние опиоидов на поддержание гомеостаза организма: противовоспалительное и иммуномодулирующее действие, улучшение микроциркуляции, общее повышение резистентности организма при различных стрессовых воздействиях. Опиоидные рецепторы были обнаружены в клетках костной ткани. Существуют уже готовые лекарственные препараты синтетических опиоидных пептидов периферического действия. Единственным из них, позиционирующимся как препарат, влияющий на регенерацию, является аналог лей-энкефалина – даларгин. Целью исследования было выяснить, может ли даларгин влиять на репаративную регенерацию костной ткани в результате стимуляции клеточных рецепторов.

**Материалы и методы.** Исследования проводились на клеточных культурах ММСК (мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки) и ФБД (фибробласты дермальные) от разных доноров и линии НОС (human osteosarcoma). При культивировании клеток ежедневно к ростовой среде добавляли исследуемые вещества для создания следующих концентраций: 1) даларгин, 10 мкг/л, 2) даларгин, 100 мкг/л, 3) даларгин, 1000 мкг/л 4) даларгин, 100 мкг/л, и неизбирательный блокатор опиоидных рецепторов - налоксон, 3мг/л 5) даларгин, 100 мкг/л, и налоксон, 0,5 мг/л (в этой концентрации блокирование  $\mu$ -рецепторов налоксоном не происходит), 6) физраствор - контрольная группа. После 3-х дней эксперимента клетки снимали и подсчитывали на аппарате «Пикоскель ПС-4М». Полученные данные анализировали с помощью программы SigmaPlot 12.

**Результаты.** Под действием даларгина к концу 3-го дня эксперимента происходило статистически значимое увеличение количества ММСК на 19-34% и уменьшение количества клеток НОС на 22-34% по сравнению с контролем. Статистически значимого изменения количества ФБД обнаружено не было. Наблюдалось снижение эффекта даларгина при отклонении его концентрации от 100 мкг/л; на некоторых культурах в группах с концентрацией даларгина 1000 мкг/л даже наблюдали обратный эффект. Количество клеток в группах с налоксоном не отличалось от контроля, что указывает на то, что даларгин влияет на пролиферацию ММСК и НОС в результате стимуляции клеточных рецепторов.

**Выводы.** Даларгин оказывает рецептор-опосредованное действие на пролиферацию культуры ММСК и линии НОС. Выявленная нами оптимальная концентрация даларгина - 100 мкг/л. Даларгин выраженно стимулирует пролиферацию ММСК и подавляет пролиферацию опухолевых клеток линии НОС.

# Исследование *in vitro* биологических свойств мультипотентных стволовых клеток – производных нервного гребня из бульбарного региона волосяного фолликула взрослых млекопитающих

Васильев Р.Г.<sup>1,2,3</sup>, Родниченко А.Е.<sup>2</sup>, Литвинова Л.С.<sup>3</sup>, Лабунец И.Ф.<sup>1</sup>, Новикова С.Н.<sup>1</sup>, Бутенко Г.М.<sup>1</sup>

1. ГУ “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, Киев, Украина
2. Биотехнологическая лаборатория *ilaya regeneration*, Медицинская компания *ilaya*, Киев, Украина
3. Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия

Нервный гребень (НГ) представляет собой транзиторную структуру в ходе эмбрионального развития позвоночных, дериватами которой во взрослом организме являются разнообразные анатомические структуры и клеточные типы: периферическая нервная система (нейроны и глия), мозговое вещество надпочечников, С-клетки щитовидной железы, строма (кератоциты) и эндотелий роговицы, меланоциты и т.д. В последнее десятилетие показано существование мультипотентных стволовых/прогениторных клеток – производных нервного гребня (МСК-ПНГ) во многих тканях и органах постнатального организма. Одним из таких мест является бульбарный регион (БР) волосяного фолликула (ВФ).

**Материалы и методы.** Получение культур МСК-ПНГ из БР ВФ методом эксплантатов; КОЕ-тест; получение клональных культур МСК-ПНГ; направленная дифференциация в адипо-, остео-, нейро- и глиогенном направлениях; цитохимическая и иммуноцитохимическая оценка дифференциации; исследование фенотипа МСК-ПНГ методами RT-PCR, иммуноцитохимии и проточной цитометрии; исследование влияния плотности посева, концентрации O<sub>2</sub> в составе газовой фазы и bFGF на скорость роста культур МСК-ПНГ; культивирование в специфических бессывороточных условиях для оценки способности МСК-ПНГ к сферогенезу; 3D культивирование в составе коллагенового и фибринового геля.

**Результаты.** Используя метод эксплантатов и селективную среду из БР ВФ фолликула вибрисс мышей линии FVB (самцы; 4-6 месяцев) получена культура фибробластоидных клеток, экспрессирующих характерные для клеток НГ маркеры: nestin (иммуноцитохимия и RT-PCR) и Sox-10. Тест на КОЕф показал способность фибробластоидных клеток из БР ВФ к росту в условиях клональной плотности. Эффективность колониеобразования для клеток первичной культуры составила 72,58±12,35%. При этом наблюдалось формирование колоний 3-х типов (по числу и морфологии клеток): колонии I-го типа (13,86±2,74% от общего числа колоний) – 8-10 крупных клеток с морфологическими признаками терминальной дифференциации; колонии II-го типа (31,68±8,35%) – 30-70 клеток различного размера и морфологии; колонии III-го типа (54,46±7,58%) – более 100 (от 500 до 1000) клеток, с преобладанием клеток небольшого размера без морфологических признаков дифференциации. При субклонировании колоний III-го типа (n=15; от 3-х различных животных) наблюдалось формирование новых колоний всех трех типов: I-го типа – 28,25±2,78%; II-го типа – 40,9±7,04 %; III-го типа – 31,88±4,36% от общего числа новообразованных колоний. Таким образом, КОЕф-тест показал гетерогенность фибробластоидных клеток из БР ВФ по клонотипному потенциалу и способности части клеток к самообновлению. Фенотип клеток на 3-м пассаже: nestin (75,6±13,2 % клеток), CD44 (98,92±0,78 %), CD73 (86,52±4,78 %), CD90 (97,24±3,24 %) и Sca-1 (95,5±2,81 %). МСК-ПНГ не экспрессировали пан-лейкоцитарный маркер CD45. Значительная часть клеток (42,43±11,86 %) экспрессировала CD117 (c-kit) (маркер мигрирующих клеток НГ и меланобластов). Показана способность клеток к направленной дифференциации в адипоциты, остеобласты, нейроны и Шванновские клетки, что подтверждено соответствующими цитохимическими (Oil Red O – адипоциты; Alizarin Red S – остеобласты) или иммуноцитохимическими (β-III-tubulin – нейроны;

---

S-100 – Шванновские клетки) окрашиваниями. В специфических бессывороточных условиях культивирования происходило формирование клетками флотирующих сфер. Клональные культуры, полученные из КОЕФ III-го типа, также обладали способностью к сферогенезу и мультилинейной дифференциации, что вместе со способностью к самообновлению позволяет классифицировать часть клеток в культуре как МСК-ПНГ. Исследование показало зависимость скорость роста культур от плотности посева, что служит еще одним аргументом в пользу иерархической организации данной клеточной популяции. bFGF и низкая концентрация O<sub>2</sub> ускоряли скорость роста культур и обладали синергичным эффектом. При 3D культивировании клетки выживали в составе как коллагенового, так и фибринового гелей. Однако поведение клеток и механизмы ремоделирования гелей отличались. Так, в коллагеновом геле клетки БР формировали сеть межклеточных контактов и контрактировали гель. В фибриновом геле наблюдалось появление кластеров клеток в результате их пролиферации, и происходила активная деградация геля.

**Заключение.** Из БР ВФ взрослых животных получена культура клеток с высоким пролиферативным потенциалом, экспрессирующая маркеры НГ. Часть клеток в культуре *in vitro* демонстрирует функциональные признаки стволовых клеток: клоногенность, самообновление, мультилинейную дифференциацию и сферогенез. Таким образом, БР ВФ взрослых млекопитающих содержит популяцию клеток, обладающую свойствами мультипотентных стволовых/прогениторных клеток – производных нервного гребня.

# Эффект действия белков, полученных из культивированных мезенхимальных стволовых клеток и ферментов-антиоксидантов при лечении термических ожогов органов дыхания

Волкова А.Г.<sup>1</sup>, Темнов А.А.<sup>2</sup>, Новоселов В.И.<sup>1</sup>

1. ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

2. НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, Россия

**Актуальность.** Термические ожоги являются распространенными травмами и приводят к исключительно тяжелым последствиям для здоровья человека. Особенно это относится к ожогам органов дыхания, при которых летальный исход наблюдается в 50% случаев. При термических ожогах основными поражающими факторами являются окислительный стресс, резкое усиление апоптоза клеток эпителия и развитие воспалительного процесса. Таким образом, при лечении тяжелых, ингаляционных ожогов, необходимо как нейтрализовать мощный окислительный стресс, так и уменьшить апоптоз клеток эпителия, и одновременно усилить регенерационные процессы.

**Целью** работы было изучить эффект синергизма при лечении термических ожогов фермента-антиоксиданта с совмещенными пероксидазной и супероксиддисмутазной активностями (белок PSH) и белков, полученных при культивировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК), обладающих прогенераторным, антиапоптотическим и противовоспалительным действием.

**Результаты.** В качестве экспериментальной модели был использован термический ожог верхних дыхательных путей с помощью микропарогенератора с аппликацией горячего пара непосредственно в трахею крысы. Ожог вызывает массовую гибель всех клеток эпителия трахеи с одновременным развитием острого гнойного воспаления. По гистологическим данным и по экспрессии всех белок-антиоксидантов в трахее частичное восстановление эпителия наблюдается на 7-10 день. Аппликации в течение первых 3-5 часов после ожога непосредственно в трахею белка PSH существенно предотвращает гибель клеток, и эпителий остается частично сохраненным. Аппликация белков МСК не предотвращает массовую гибель клеток, однако ускоряет процесс восстановления эпителия. Одновременная аппликация белков МСК и белка PSH практически полностью сохраняет эпителий трахеи после термического ожога. Таким образом, ярко проявляется синергизм одновременного действия мощного фермента антиоксиданта и белков прогенераторного антиапоптотического и противовоспалительного действия.



# Исследование жизнеспособности клеток, засеянных на синтетический каркас трахеи

И.В. Гилевич<sup>1</sup>, А.С. Сотниченко<sup>1</sup>, Е.А. Губарева<sup>1</sup>, Е.В. Кувейда<sup>1</sup>, Й. Хааг<sup>2</sup>, Ф. Юнгеблут<sup>2</sup>, Т.В. Федоренко<sup>1</sup>, И.А.Пашкова<sup>1</sup>, И.С.Поляков<sup>1</sup>, В.А.Порханов<sup>1</sup>, П. Маккиарини<sup>1,2</sup>

1. Кубанский государственный медицинский университет, Международный научно-исследовательский клинично-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия

2 Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция

**Цель работы:** изучить жизнеспособность клеток, засеянных на синтетический каркас трахеи.

**Материалы и методы:** В работе использовались взрослые крысы-самцы линии Lewis весом  $180 \pm 16$  г. Из большеберцовых костей животных была выделена фракция костного мозга. Полученная взвесь клеток была нанесена на синтетический каркас трахеи. Синтетический каркас был создан фирмой-производителем на основании метода электроспиннинга. Каркас был фиксирован в специально разработанном биореакторе Harvard Apparatus. Для стимуляции роста и дифференцировки клеток в каркас были введены гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, эритропоэтин, инсулин, дексаметазон, и трансформирующий фактор роста –  $\beta$ . Для оценки жизнеспособности клеток на каркасе был выполнен колориметрический метод исследования с помощью МТТ-реактива (Trevigen's TACS® MTT Cell Proliferation Assay). Для проведения МТТ-теста были взяты образцы культивируемого каркаса размером  $0,5 \times 0,5 \text{ см}^2$ , помещены в 24-луночный планшет, была добавлена питательная среда объемом 500 мкл. После чего в каждую из лунок был добавлен реагент МТТ объемом 50 мкл. Планшет был инкубирован 4 часа при температуре  $37^\circ\text{C}$ , и 5%  $\text{CO}_2$ . После в каждую из лунок был добавлен детергент натрия додецилсульфат – 500 мкл, лунки инкубировали в течение 1 часа. В качестве контроля были использованы образцы каркаса без нанесения клеток, и только культивируемые клетки в лунках. Результаты были оценены на спектрофотометре при длине волны 570 нм. Статистический анализ проводился с помощью программы GraphPad Prism. С целью оценки морфологической картины культивируемого синтетического каркаса использовали рутинные методики гистологической окраски (гематоксилином и эозином).

**Результаты:** Колориметрический метод МТТ-тест основан на избирательной редукции солей тетразолия метаболически активными клетками, в частности, под действием ферментов дегидрогеназы. Образующийся внутриклеточный фиолетовый формазан количественно оценивается спектральным методом. При оценке данных при длине волны 570 нм было выявлено, что показатели лунок, в которых были помещены образцы засеянного клетками синтетического каркаса соответствовали показателям лунок, содержащих только клетки, в то время как результаты исследования лунок, в которых был только каркас без нанесения клеток, были ниже, что являлось статистически достоверным ( $p < 0,005$ ). Полученные результаты свидетельствуют, что клетки, культивируемые на каркасе, остаются жизнеспособными. При окрашивании гематоксилином и эозином были обнаружены фибробластоподобные клетки. Патологические изменения структуры волокон, клеток не выявлялись.

**Выводы:** Использование МТТ-теста является надежным и удобным методом оценки жизнеспособности клеток на каркасах, требует мало времени, получаемые результаты достоверны. Однако требуется продолжить изучение взаимодействия клеток и синтетического каркаса, а также воздействия цитокинов на клетки, засеянных на каркасе.

# Исследование влияния комбинации VEGF165 и HGF на ангиогенез в ишемизированном миокарде крысы и продукцию хемокинов эндотелием

Глуханюк Е.В.<sup>1</sup>, Галлингер Ю.О.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>1,2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. НИИ Экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

**Актуальность:** Несмотря на значительный успех в контроле факторов риска и лечения, ишемические заболевания и их осложнения продолжают лидировать среди причин смерти в экономически развитых странах. В связи с этим актуальность приобрела группа подходов под общим названием «терапевтический ангиогенез», которые направлены на усиление данных адаптационных процессов. При этом монофакторная генная терапия, показавшая неплохую эффективность на доклинических моделях ИБС, ХИНК, и в небольших клинических исследованиях, однако, дала неудовлетворительные результаты в крупных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях. Применение комбинации факторов - потенциальный путь к повышению эффективности генной терапии. Одной из наиболее перспективных пар факторов роста является VEGF165 и HGF, ангиогенная эффективность которой была показана в ряде исследований *in vitro* и *in vivo*.

**Цель исследования:** оценить влияние комбинированной генной терапии факторами VEGF165 и HGF на ангиогенез в ишемизированном миокарде крысы, а также изучить влияние данной комбинации факторов на продукцию эндотелием плеотропных хемокинов, участвующих в регуляции воспаления и ангиогенеза.

**Материалы и методы:** В работе использована линия крыс Wistar. После перевязки левой коронарной артерии по краю развивающегося инфаркта миокарда вводился раствор либо одиночных плазмид VEGF165 и HGF, либо их комбинация (в качестве отрицательного контроля PBS; в дозе по 250 мкг/250 мл физиологического раствора при использовании одиночных плазмид и в дозе 250 мкг+250 мкг/250 мл физиологического раствора при использовании комбинации плазмид). На 14 сутки животные умерщвлялись, производилась препаровка сердца и изготовление гистологических препаратов, которые окрашивались на CD31+ (для оценки плотности капилляров ми миокарде левого желудочка) и по Маллори (для оценки площади постинфарктного фиброза).

Для опытов *in vitro* клетки HUVEC или линейные TIME высаживались на 6-луночный планшет и по достижении 80% плотности проводилась стимуляция клеток VEGF с концентрацией 25 нг/мл, HGF с концентрацией 25 нг/мл и их комбинацией (в концентрации по 12,5 нг/мл каждого или по 25 нг/мл каждого). Далее клетки инкубировались при стандартных условиях 20 часов, после чего культуральные среды собирались и замораживались, а клетки лизировались. Концентрация белков IL-8 и MCP-1 в собранной среде определялась с помощью ИФА. Клеточный лизат использовали для проведения вестерн-блота и определения содержания фосфорилированной формы регуляторного белка IKB (pIKB).

**Результаты:** При морфометрическом анализе гистологических образцов миокарда, полученных на 14-ый день после внутримиокардиального введения плазмид, нами выявлено повышение плотности CD31+ капилляров как при введении плазмиды с геном VEGF165, так и HGF. При введении комбинации плазмид VEGF165 и HGF было отмечено значимое (максимальное) увеличение плотности CD31+ капилляров по сравнению с отрицательным контролем и группами одиночных плазмид с этими генами. Также выявлено значимое снижение площади фиброза в постинфарктном миокарде при введении плазмиды с геном VEGF165 и при введении комбинации плазмид с генами VEGF165 и HGF по сравнению с отрицательным контролем. При введении плазмиды с геном HGF площадь фиброза также снижалась, хотя различия не достигали статистической значимости.

---

По данным ИФА VEGF является мощным стимулятором секреции MCP-1 (в 2,2 раза по сравнению отрицательным контролем на культуре HUVEC и в 3,8 раз на культуре TIME) и IL-8 (2,8 и 5,2 соответственно). HGF подавлял секрецию MCP-1 (0,86 и 0,82), и являлся довольно слабым активатором секреции IL-8 (1,75 и 1,74). Отличия в наблюдались при стимуляции клеток комбинацией VEGF/HGF - в случае с MCP-1 отмечалось снижение VEGF-опосредованного роста продукции (1,65 и 2,23; вероятно, под влиянием HGF), а случае с IL-8 наблюдался аддитивный эффект с максимальным уровнем секреции (4,0 и 5,71).

По результатам иммуноблоттинга было обнаружено, что стимуляция клеток VEGF приводило к повышению концентрации pIKB (фосфоформы ингибиторной молекулы для транскрипционного фактора NFκB), под влиянием HGF наблюдалось ее снижение, а комбинация VEGF/HGF давала промежуточные значения концентраций.

### **Выводы:**

- 1.** Генная терапия комбинацией VEGF и HGF позволяет к 14-му дню добиться значимого увеличения плотности капилляров в ишемизированном миокарде. Антифибротическое действие было показано только для VEGF и его комбинации с HGF, причем аддитивности эффектов не наблюдалось.
- 2.** Компьютерный анализ указал на значимую вероятность активации процессов воспаления под влиянием VEGF, уменьшение их активности под действием HGF и возможные изменения экспрессии белков из семейства хемокинов (в частности, IL-8 и MCP-1).
- 3.** На культуре клеток эндотелия нами было показано уменьшение продукции MCP-1 под влиянием комбинации VEGF и HGF, однако для IL-8 динамика оказалась прямо противоположной – максимальное содержание IL-8 было выявлено в среде, собранной через 20 часов после стимуляции VEGF и HGF.
- 4.** При анализе активности регуляторного цикла NF-κB оказалось, что HGF способен уменьшать его VEGF-опосредованную стимуляцию, что соотносилось с данными по продукции MCP-1. Касательно IL-8 в нашем случае наиболее рациональным было бы предположить наличие альтернативного механизма регуляции, который вносит существенный вклад в его продукцию помимо каскада NF-κB.

## **Характеристика мононуклеаров костного мозга мышей после длительного космического полета**

Гончарова Е.А., Бобылева П.И., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

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

Изучение влияния факторов космического полета на стволовые клетки взрослого организма, а также процессы восстановления после воздействия является важной задачей космической биологии и медицины. Уникальную возможность для изучения постполетных изменений популяции клеток костного мозга, в состав которых входят как гемопоэтические, так и стромальные стволовые клетки, предоставила программа «Бион М1». В рамках этого проекта мыши C57/Bl/6 были разделены на контрольные и экспериментальные группы: космический полет/виварный контроль, восстановление после космического полета/виварный контроль, синхронный эксперимент/виварный контроль, синхронный эксперимент после восстановления/виварный контроль.

Из большеберцовой кости животного выделяли мононуклеары костного мозга, в камере Небауэра определяли их число, далее клетки пулировали, иммунофенотипировали с помощью антител против CD45, CD34, CD90 и проанализировали на проточном цитофлуориметре Epics XL (Beckman Coulter). Часть клеток каждого пула замораживали для последующего исследования наличия гемопоэтических колониеобразующих единиц (КОЕ), остальные использовали для культивирования для оценки числа КОЕ-ф, пролиферативной активности и способности к спонтанной остеодифференцировке.

При осмотре большеберцовых костей, из которых выделялись клетки костного мозга, в экспериментальных группах космического полета и синхронного эксперимента были обнаружены признаки остеомалации: размягчение и повышенная ломкость костей, которые практически исчезали в группах восстановления. В контрольных группах все кости соответствовали возрастной норме.

При сравнении числа клеток в каждой экспериментальной группе с соответствующим контролем достоверной разницы не было обнаружено. Количество клеток варьировало: в группах полет/контроль от  $21,7 \pm 3,07$  до  $26,9 \pm 1,3$  млн. клеток, полет-восстановление /контроль от  $21,4 \pm 2,1$  до  $22,3 \pm 2,4$  млн. клеток, синхрон/контроль от  $18,2 \pm 0,9$  до  $21,8 \pm 1,1$  млн. клеток, синхрон- восстановление/контроль от  $20,7 \pm 2,2$  до  $25,9 \pm 1,6$  млн. клеток. Анализ на проточном цитофлуориметре клеток всех групп позволил четко выделить две субпопуляции, отличающиеся по размеру клеток: 1 – мелкие, 2 – крупные клетки. Иммунофенотип первой субпопуляции CD45+ (34,6–71,5%), CD90+ (7,2–15,6%), CD34+ (0,5–3%). Иммунофенотип второй субпопуляции CD45+ (80–97%), CD90+ (0,9–4,5%), CD34+ (0,6–2,4%). Таким образом, вторая субпопуляция отличалась наибольшим содержанием клеток с панлейкоцитарным антигеном, а также большей долей CD90+ клеток по сравнению с первой популяцией. Число CD34+ недифференцированных гемопоэтических предшественников в обеих субпопуляциях было мало.

Анализ клеток первичной культуры показал, что различия в количестве КОЕ-ф и приросте клеток между экспериментальными и контрольными группами были несущественными. Стромальные предшественники демонстрировали высокую активность щелочной фосфатазы – раннего маркера остеогенной дифференцировки.

Полученные данные показывают, что факторы космического полета и наземного синхронного эксперимента не оказали повреждающего влияния на число, иммунофенотип, пролиферативный и дифференцировочный потенциал ядродержащих клеток костного мозга большеберцовой кости мышей.

## Роль молекул адгезии в иммуносупрессорном механизме ММСК

Горюнов К.В., Романов А.Ю., Рубцов Ю. П. , Ткачук В.А.

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

Последние исследования ММСК показали, что эти клетки способны регулировать активность участников иммунного ответа в очаге воспаления: Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, дендритных клеток и макрофагов, влияя на их функции путём подавления активности или пролиферации. На данный момент предполагают наличие нескольких механизмов иммуносупрессии, зависящих от условий взаимодействия между клетками: путем физических контактов или с помощью растворимых факторов [1].

Анализ литературы показал, что роль молекул адгезии в контакт-контактном механизме иммуносупрессии не изучена до конца. Поэтому мы попытались оценить участие предполагаемых молекул адгезии ICAM, VCAM, PECAM, N-CAD, P-CAD, T-CAD, E-SEL, L-SEL, P-SEL во взаимодействии ММСК с лимфоцитами периферической крови (ЛПК), сделав при этом акцент на Т-клетках. Т-клетки были выбраны, поскольку они играют ключевую роль в воспалительном ответе.

Нами была использована система *in vitro* сокультивирования ММСК с активированными и не активированными МПК в условиях контактного и бесконтактного взаимодействия в соотношениях МСК к МПК 1:10, 1:25, 1:50, 1:100. В качестве контроля использовали культивированные отдельно ММСК и МПК. После проводили оценку изменения профиля экспрессии мРНК молекул адгезии и в МПК, и в ММСК.

Воздействие ММСК на МПК анализировали по профилю экспрессии мРНК IDO, который является одним из маркеров иммуносупрессорного действия ММСК. IDO, секретируемый ММСК, метаболизирует триптофан в кинуренин, который, как предполагают, вызывает в лимфоцитах апоптоз или индукцию в регуляторный фенотип. В свою очередь истощение внеклеточного триптофана, необходимого для активного деления, приводит к снижению пролиферации лимфоцитов периферической крови [2].

По нашим предварительным данным, молекулы VCAM, PECAM, N-CAD, P-CAD, T-CAD, E-SEL, L-SEL, P-SEL вероятно не участвуют в механизме иммуносупрессии, так как уровень их мРНК изменялся в незначительных пределах. В то же время, мы полагаем, что ICAM может играть важную роль в исследуемом процессе, так как уровень его мРНК существенно изменялся в десятки раз и у ММСК, и у активированных МПК при контакт-контактном взаимодействии в соотношении 1:25 по сравнению с контролями. Этот результат хорошо согласуется с литературными данными и свидетельствует о возможной роли ICAM в запуске иммуносупрессивного ответа при непосредственном контакте между ММСК и МПК. Установка основных участников контакт-контактного механизма иммуносупрессии является дальнейшей целью нашего исследования.

1. Dazzi F. et al., (2012) Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'?, *Immunology*, 137, 206–213
2. Ball H. J. et al., (2009) Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway., *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 467–471

## Децеллюляризованный матрикс диафрагмы крысы для проведения *in vivo* имплантации

Е.А. Губарева<sup>1</sup>, А.С. Сотниченко<sup>1</sup>, И.В. Гилевич<sup>1</sup>, Е.В. Куевда<sup>1</sup>, А.В. Попова<sup>1</sup>, Й. Хааг<sup>2</sup>, Ф. Юнгблут<sup>2</sup>, С.В. Крашенинников<sup>3</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>3</sup>, С.Н. Чвалун<sup>3</sup>, П. Маккиарини<sup>1,2</sup>

1. Кубанский государственный медицинский университет, Международный научно-исследовательский клинико-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия
2. Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция
3. Курчатовский НБИКС-центр НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

Необходимыми условиями для получения идеальногодецеллюляризованного диафрагмального матрикса являются его биосовместимость, нетоксичность, стерильность, сохранность механических свойств (растяжимость и прочность), отсутствие развития иммунных реакций и необходимости иммуносупрессивной терапии. Целью нашей работы было получение децеллюляризованного матрикса диафрагмы с использованием авторского биореактора для последующей рецеллюляризации мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК).

**Материалы и методы:** В эксперименте были использованы 16 взрослых крыс-самцов линии Lewis, весом  $180 \pm 16$ г. Децеллюляризация диафрагмы крыс проводилась детергент-энзиматическим методом в течение 24 часов путем сочетания метода взбалтывания (на ротирующей платформе) и перфузии растворов через заднюю полую вену в специально разработанном биореакторе. Для рецеллюляризации каркаса были использованы ММСК крыс. Для оценки проведенной децеллюляризации и рецеллюляризации использовали: морфологический анализ с помощью рутинных методов гистологической окраски гематоксилином и эозином, по Массону, по Ван-Гизон; иммуногистохимический анализ качественного содержания коллагена I и IV типов, ламинина, эластина, фибронектина, тропомиозин и МНС I типа; количественное определение ДНК в децеллюляризованной ткани; колориметрический анализ (МТТ-тест); сканирующую электронную микроскопия (СЭМ); подкожную имплантацию децеллюляризованных матриксов; антиоксидантный тест.

**Результаты:** Децеллюляризованный матрикс диафрагмы сохранял важные биологические и биомеханические (осевая нагрузка) свойства. Морфологический анализ позволил выявить отсутствие клеток в децеллюляризованном матриксе, неповрежденную пористую структуры внеклеточного матрикса (ВКМ). При этом основные белки ВКМ были сохранены (положительная ИГХ реакция с антителами к коллагену I, коллагену IV, ламинину, фибронектину и эластину, негативная реакция с антителами к тропомиозину). Данные количественного определения ДНК показали, что около 74% ядерного материала ( $p < 0,05$ ) было удалено после децеллюляризации. Кроме того, децеллюляризованный матрикс был не токсичен, клетки сохраняли свою пролиферативную способность и жизнеспособность. *In vitro* и *in vivo* результаты показали низкую продукцию активных форм кислорода и иммунологическую активность полученного каркаса.

В заключение, наши результаты показали, что модифицированный нами укороченный протокол децеллюляризации диафрагмы с использованием авторского биореактора может представлять интерес в создании тканеинженерной диафрагмы, которая структурно и механически похожа на нативный ВКМ диафрагмы. Разработка тканеинженерного органа представляет собой многообещающую перспективу для использования в качестве неиммуногенного и нетоксичного трансплантата.

## Децеллюляризованный матрикс диафрагмы крысы для проведения *in vivo* имплантации

Е.А. Губарева<sup>1</sup>, А.С. Сотниченко<sup>1</sup>, И.В. Гилевич<sup>1</sup>, Е.В. Куевда<sup>1</sup>, А.В. Попова<sup>1</sup>, Й. Хааг<sup>2</sup>, Ф. Юнгблут<sup>2</sup>, С.В. Крашенинников<sup>3</sup>, Т.Е. Григорьев<sup>3</sup>, С.Н. Чвалун<sup>3</sup>, П. Маккиарини<sup>1,2</sup>

1. Кубанский государственный медицинский университет, Международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия
2. Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция
3. Курчатовский НБИКС-центр НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

Необходимыми условиями для получения идеальногодецеллюляризованного диафрагмального матрикса являются его биосовместимость, нетоксичность, стерильность, сохранность механических свойств (растяжимость и прочность), отсутствие развития иммунных реакций и необходимости иммуносупрессивной терапии. Целью нашей работы было получение децеллюляризованного матрикса диафрагмы с использованием авторского биореактора для последующей рецеллюляризации мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК).

**Материалы и методы:** В эксперименте были использованы 16 взрослых крыс-самцов линии Lewis, весом  $180 \pm 16$ г. Децеллюляризация диафрагмы крыс проводилась детергент-энзиматическим методом в течение 24 часов путем сочетания метода взбалтывания (на ротирующей платформе) и перфузии растворов через заднюю полую вену в специально разработанном биореакторе. Для рецеллюляризации каркаса были использованы ММСК крыс. Для оценки проведенной децеллюляризации и рецеллюляризации использовали: морфологический анализ с помощью рутинных методов гистологической окраски гематоксилином и эозином, по Массону, по Ван-Гизон; иммуногистохимический анализ качественного содержания коллагена I и IV типов, ламинина, эластина, фибронектина, тропомиозин и МНС I типа; количественное определение ДНК в децеллюляризованной ткани; колориметрический анализ (МТТ-тест); сканирующую электронную микроскопия (СЭМ); подкожную имплантацию децеллюляризованных матриксов; антиоксидантный тест.

**Результаты:** Децеллюляризованный матрикс диафрагмы сохранял важные биологические и биомеханические (осевая нагрузка) свойства. Морфологический анализ позволил выявить отсутствие клеток в децеллюляризованном матриксе, неповрежденную пористую структуры внеклеточного матрикса (ВКМ). При этом основные белки ВКМ были сохранены (положительная ИГХ реакция с антителами к коллагену I, коллагену IV, ламинину, фибронектину и эластину, негативная реакция с антителами к тропомиозину). Данные количественного определения ДНК показали, что около 74% ядерного материала ( $p < 0,05$ ) было удалено после децеллюляризации. Кроме того, децеллюляризованный матрикс был не токсичен, клетки сохраняли свою пролиферативную способность и жизнеспособность. *In vitro* и *in vivo* результаты показали низкую продукцию активных форм кислорода и иммунологическую активность полученного каркаса.

В заключение, наши результаты показали, что модифицированный нами укороченный протокол децеллюляризации диафрагмы с использованием авторского биореактора может представлять интерес в создании тканеинженерной диафрагмы, которая структурно и механически похожа на нативный ВКМ диафрагмы. Разработка тканеинженерного органа представляет собой многообещающую перспективу для использования в качестве неиммуногенного и нетоксичного трансплантата.

# Фармакологическая стратегия регенеративной медицины

Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзьков Г.Н.

ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН, Томск, Россия

Одним из рациональных подходов к решению задач регенеративной медицины является фармакологическое управление функционированием эндогенных стволовых клеток, основанное на принципе подражания естественным регуляторным системам их функционирования в организме. Оптимальную мишень для этого представляют собой мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые благодаря высокой степени своей пластичности способны дифференцироваться в клетки самых различных тканей.

Целью работы явилось изучение роли мезенхимальных клеток-предшественников в развитии патологических процессов, механизмов их регуляции и разработка патогенетически обоснованных методов фармакологической стимуляции их мобилизации и дифференцировки в специализированные клетки на моделях некоторых распространенных заболеваний: инфаркта миокарда (лигирование левой коронарной артерии); токсического гепатита, воспроизводимого введением СС14; сахарного диабета, вызываемого аллоксаном; гипоксической энцефалопатии, блеомицинового пневмофиброза, а также на модели длительно заживающей кожной раны. Все эксперименты проводились в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных после одобрения программы исследований IACUC. В работе применялись культуральные, биохимические, иммунологические, электрофизиологические, морфологические методы.

Анализ данных, полученных на различных моделях патологических процессов, показал, что изменения со стороны резервных систем клеточного обновления являются, по-видимому, неспецифическими и однотипными, несмотря на некоторые характерные черты, определяющиеся природой действующего болезнетворного фактора. Однако наблюдавшаяся в большинстве случаев активация костномозговых стволовых клеток оказывалась при этом недостаточной для компенсации имеющихся повреждений. Курсовое введение препарата Г-КСФ, мобилизующего мезенхимальные стволовые клетки, способствовало более полной реализации их регенераторного потенциала. После стимулированного выхода из депо, миграции и хоминга мезенхимальные прогениторы дифференцировались в рабочую ткань соответствующего органа, либо элементы микроокружения, которые опосредованно ускоряют течение репаративных процессов поврежденных тканей. Применение иммобилизированной на различных полимерах гиалуронидазы (имГД) приводило к последовательной стимуляции процессов пролиферации и дифференцировки как регионарных стволовых клеток различных органов, так и прогениторных элементов тканей-депо. Причем в последнем случае их активация сопровождалась и максимально направленной их миграцией в пораженные органы. Механизмами действия имГД являются не только воздействие на межклеточный матрикс, но и влияние на секреторную и адгезивную функции клеточных элементов микроокружения.

Показано также, что изменение функциональной активности внутриклеточных сигнальных каскадов может существенно влиять на интенсивность процессов пролиферации и дифференцировки родоначальных клеток различных классов, и, соответственно, представляет собой возможный способ фармакологической активации регенераторных процессов.

Полученные результаты в целом свидетельствуют о перспективности фармакологической модификации функций различных эндогенных клеток-предшественников путем воздействия на естественные регуляторные системы их функционирования в организме.



# Активация факторов системы урокиназы и матриксных металлопротеиназ (ММП) в мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках жировой ткани пожилых пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС)

Ефименко А.Ю.<sup>1</sup>, Джояшвили Н.А.<sup>1</sup>, Калинина Н.И.<sup>1</sup>, Акчурин Р.С.<sup>2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

**Актуальность.** Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) играют важную роль в процессах репарации и регенерации тканей, благодаря высокому пролиферативному и дифференцировочному потенциалу и способности стимулировать рост сосудов и нервов, в первую очередь, за счет продукции широкого спектра различных цитокинов и факторов роста. Кроме того, было показано, что ММСК-ЖТ секретируют урокиназу и матриксные металлопротеиназы (ММП), принимающие активное участие в ремоделировании внеклеточного матрикса (ВКМ) и протеолитических процессах высвобождения и активации факторов роста. Ранее мы показали, что способность ММСК, выделенных из жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), стимулировать ангиогенез ухудшается с возрастом из-за сниженной секреции клетками ключевых проангиогенных факторов роста. Целью данного исследования было определить изменения системы факторов внеклеточного протеолиза в ММСК-ЖТ больных ИБС при старении.

**Материалы и методы.** ММСК-ЖТ были выделены из подкожной жировой ткани пациентов с ИБС (n=64, возраст 43-77 лет). Для экспериментов использовали клетки 2 пассажа. Иммунофенотип клеток был определен с помощью проточной цитофлуорометрии как CD90+/CD73+/CD105+/CD45-/CD31- – для всех образцов, и была подтверждена мультипотентность клеток путем индукции адипогенной и остеогенной дифференцировки. Относительную длину теломеров, содержание мРНК урокиназы (uPA), ее рецептора (uPAR), ингибитора активатора плазминогена-1 (PAI-1), ММП-2 и -9 определяли методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Экспрессию uPAR на поверхности ММСК-ЖТ оценивали с помощью проточной цитофлуорометрии. Содержание про- и активных форм ММП-2 и -9 в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ определяли методом зимографии. Проводили количественную оценку PAI-1 в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ методом иммуноферментного анализа (ELISA).

**Результаты.** Корреляционный анализ показал, что в ММСК, выделенных из жировой ткани пожилых пациентов, относительная длина теломеров была снижена ( $r=-0,6$ ,  $p=0,006$ ), а содержание мРНК uPAR и PAI-1 повышено ( $r=0,46$ ,  $p=0,001$  и  $r=0,47$ ,  $p=0,001$ , соответственно) по сравнению с клетками пациентов более молодого возраста. Уровень экспрессии uPAR на поверхности ММСК-ЖТ также коррелировал с возрастом пациентов ( $r=0,65$ ,  $p=0,01$ ). Кроме того, ММСК-ЖТ, имевшие более низкий показатель относительной длины теломеров, секретируют больше PAI-1 в среду культивирования ( $r=-0,41$ ,  $p=0,02$ ). Содержание про-ММП-2 и про-ММП-9 было повышено в кондиционированной среде от ММСК-ЖТ пожилых пациентов по сравнению с пациентами более молодого возраста ( $p<0,05$ ). Мы наблюдали похожую тенденцию для активных форм ММП-2 и ММП-9, однако различия не достигали статистической значимости.

**Выводы.** С возрастом в ММСК-ЖТ пациентов с ИБС происходит активация системы факторов внеклеточного протеолиза: повышение экспрессии uPA и uPAR, увеличение продукции клетками PAI-1 и про-ММП-2 и -9. Это может отражать реакцию прогениторных стромальных клеток на изменения ВКМ, происходящие при старении, повышенный уровень провоспалительных факторов и активных форм кислорода, а также может рассматриваться в

---

качестве компенсаторного механизма для более эффективной активации факторов роста, продукция которых снижается с возрастом.

**Финансовая поддержка.** Работа выполнена при финансовой поддержке Государственного контракта № 16.512.11.2251 Министерства образования и науки Российской Федерации, а также гранта №241558 (SICA-HF) Седьмой рамочной программы Европейского союза [FP7/2007-2013], Государственного контракта №02.527.11.0007 Министерства образования и науки Российской Федерации и гранта №16.512.11.2262 Федерального агентства науки и инноваций Российской Федерации.

# Биоразлагаемые пористые матрицы из поли-3-оксибутирата-со-полиэтиленгликоля как подложка для роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток

Жаркова И.И., Акулина Е.А

Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Создание трехмерных пористых матриц с последующим культивированием на них стволовых клеток является одной из наиболее актуальных задач в тканевой инженерии. Нами были разработаны два типа таких подложек из сополимера биосовместимого полимера полиоксибутирата и полиэтиленгликоля (ПОБ-ПЭГ). Также показано, что использование данных матриц как подложки для роста мезенхимальных стволовых клеток (МСК) весьма перспективно.

**Введение.** Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются одними из самых популярных линий клеточных культур, используемых в регенеративной медицине и тканевой инженерии, поскольку они могут трансформироваться в любые клетки соединительной ткани, будь то костная, хрящевая, жировая и другие. В то же время актуальным направлением в биоинженерии является создание различных объемных структур- матриц для использования их в качестве подложек при трансплантации клеток. Такой матрикс должен обладать тремя основными свойствами: биосовместимостью, биодеградацией и стимулировать пролиферацию клеток ткани.

**Цель.** Нашей задачей была разработка матриц на основе полимера микробиологического происхождения полиоксибутирата (ПОБ), его сополимеров и композитов, а также оценка биосовместимости этих матриц *in vitro* на культуре МСК.

**Материалы и методы.** В нашей работе использовался сополимер полиоксибутирата и полиэтиленгликоля (ПОБ-ПЭГ) как наиболее перспективный для применения в медицине. Полимер получали микробиологическим путем из высокопродуктивного штамма- продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б. Биосинтез, выделение и очистка полимера описаны в работе [1].

Пористые структуры из полимера получали двух типов. Пористые плоские матрицы создавали с помощью метода порообразования с использованием газообразователя, в качестве которого был выбран карбонат аммония. Объемные структуры - методом формирования из раствора на пористом 3D шаблоне. Здесь в качестве вымываемого вещества был использован кубик рафинированного сахара, который являлся формообразователем.

МСК были получены из костного мозга мышей возрастом 1 месяц линии Balb/C: были выделены трубчатые кости задних конечностей, которые механически измельчали и инкубировали с коллагеназой типа I при 37°C в течении часа и затем полученную суспензию клеток высаживали на культуральную посуду.

Биосовместимость полученных матриц оценивали с помощью стандартного метода оценки жизнеспособности клеток и биосовместимости полимерных материалов, ХТТ.

**Результаты и обсуждения.** Нами была разработана методика создания трехмерных объемных пористых матриц из биоразлагаемого сополимера ПОБ-ПЭГ с помощью 3D-шаблона и более плоских по форме матриц с помощью газообразователя. Прежде всего, получение этих пористых систем направлено на создание более оптимальных условий для прикрепления и пролиферации клеток, а также для культивирования клеток в объеме, а не на плоскости. Нами было показано, что на объемных пористых матрицах наблюдалась более продолжительная динамика роста культуры, чем на более плоских пористых матрицах и гораздо более продолжительная по сравнению с пленочными поверхностями, где после образования монослоя, культура клеток быстро деградирует.

**Выводы.** Полученные данные позволяют говорить о возможности использования 3D пористых матриц из ПОБ-ПЭГ для длительного культивирования МСК с целью дифференцировки в различные типы клеток, а впоследствии для заполнения дефектов различных тканей и их регенерации.

# Влияние мутаций в гене ламина А/С на дифференцировочные свойства стромальных клеток жировой ткани

Забирник А.<sup>1,2,3</sup>, Малашичева А.<sup>1</sup>, Смолина Н.<sup>1</sup>, Дмитриева Р.<sup>1</sup>, Костарева А.<sup>1</sup>, Омельченко Е.<sup>2</sup>

1. ФГБУ «Федеральный Центр сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия
2. Лаборатория клеточных биотехнологий "Virola", Харьков, Украина
3. В.Н. Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, Харьков, Украина

Мутации в гене ламина А/С (LMNA) приводят к развитию группы тяжелых заболеваний - ламинопатий. Детальный механизм воздействия ламиновых мутаций до сих пор неясен, и, возможно, связан с изменениями в ядерном сигналинге и транскрипционных процессах. Так как при ламинопатиях более всего страдают ткани мезенхимального происхождения, в частности жировая, была изучена роль ламина А/С в процессах дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток – стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) – в адипогенном направлении.

Мутагенез *in vitro* был проведен на гене LMNA дикого типа клонированном в лентивирусный вектор. Несколько ранее описанных мутаций LMNA были выбраны для исследования, каждая из которых преимущественно связана с определенным фенотипом: R471C - кардиомиопатия, R482L - липодистрофия, G465D – миодистрофия и липодистрофия, R527C – прогероидный синдром. СКЖТ, полученные от здоровых доноров, были трансдуцированы лентивирусными векторами, несущими LMNA - мутантные или дикого типа. Оценку влияния экспрессии мутантных форм ламина А на дифференцировку СКЖТ проводили двумя путями: программным анализом большого массива микрофотографий, полученных на окрашенных специфическим красителем культурах клеток; анализ экспрессии избранных маркеров адипоцитарной дифференцировки (МАД) (PPARG, SREBP и адипсина) на разных сроках дифференцировки с помощью qPCR а также анализ 84 прямо или косвенно связанных с адипогенезом генов на раннем сроке дифференцировки.

Нами отмечено фенотипическое усиление эффекта дифференцировки для большинства исследуемых мутаций, за исключением мутации R471C (2.2 раза для мутации G465D, 0.76 для R471C, 2,52 для R482L, 2.93 для R527C) по сравнению с контролем. Для МАД также было отмечено повышение уровня экспрессии для исследуемых мутаций. Уровень PPARG был повышен на всех этапах дифференцировки при всех исследовавшихся мутациях. На уровень экспрессии маркера SREBP1 наибольшее влияние оказывала мутация R471C на терминальной стадии дифференцировки. На экспрессию адипсина в ходе дифференцировки более всего влияли мутации G465D и R471C. Интересно, что наименее выраженное морфологически влияние на дифференцировку оказывала мутация R471C, в то же время именно эта мутация оказывала наибольшее влияние на экспрессию адипогенных маркеров PPARG, SREBP и адипсина. Это, вероятно, связано с тем, что R471C ассоциирована с кардиомиопатийным фенотипом, и для нее не было описано вовлечения в патогенез жировой ткани. Предварительные данные анализа экспрессии большого массива генов подтверждают ранее полученные результаты и находятся в стадии обработки.

Мутации гена ламина А / С обладают сильным, различающимся между мутациями, воздействием на процесс дифференцировки СКЖТ в адипогенном направлении. Показано как фенотипическое усиление процента дифференцировки, так и повышение уровня экспрессии ранних МАД для большинства мутаций. А для мутации R471C это было справедливо на всех исследуемых сроках, наблюдаемым для с наибольшим эффектом относительно других мутаций, но с низким процентом фактически продифференцировавшихся клеток.

# **Сравнительная характеристика уровней экспрессии иммуномодуляторных молекул в культурах мезенхимальных стромальных клеток из внезародышевых тканей и эндометрия человека**

Захаров А.В., Метлюк Е.А., Сердюк Я.В., Чулкина М.М., Савилова А.М.

*ФГБУ "Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. ак. В.И. Кулакова"  
Минздрава РФ, Москва, Россия [a\_zaharov@oparina4.ru]*

Клеточная терапия является одним из самых многообещающих направлений в современной медицине. Одним из направлений клеточных технологий является использование мезенхимальных стромальных клеток (МСК), которые представляют собой соматические стволовые клетки и могут дифференцироваться в клетки мезодермального происхождения. Важным преимуществом этих клеток является простота их получения и культивирования. Относительно недавно *in vitro* и *in vivo* были описаны иммунорегуляторные свойства МСК, которые являются эффективным инструментом для преодоления реакции «трансплантат против хозяина», а также могут быть использованы с целью терапии различных хронических воспалительных расстройств, несостоятельности эндометрия, бесплодия и т.д.

В нашей работе было проведено сравнение уровней экспрессии иммуномодуляторных молекул в культурах МСК из внезародышевых тканей (полученных из амниотической оболочки, пупочного канатика, ворсин хориона и трофобласта плаценты) и эндометрия взрослого человека. В исследованных МСК были обнаружены и количественно охарактеризованы на разных пассажах мРНК ряда генов, участвующих в процессах пролиферации, воспалительных, противовоспалительных и ангиогенных процессах, таких как *tgfb*, *il6*, *il10*, *il1β*, *vegf165* и *foxp3*. Помимо наличия мРНК в МСК, была измерена концентрация в культуральной среде таких белков как интерлейкин-10, интерлейкин-6 и TGFβ. При культивировании МСК без индукторов не удалось обнаружить мРНК генов таких провоспалительных факторов как TNFα и IFNγ. Полученные результаты свидетельствуют об иммунорегуляторной активности выделенных клеток, что подтверждает возможность использования этих клеток в терапии хронических воспалительных процессов, несостоятельности эндометрия, бесплодия иммунного генеза и т.п.

## Биоинженерные подходы к изучению регенерации хрящевой ткани внезародышевых тканей и эндометрия человека

Д.А. Зубов<sup>1,2,3</sup>, Р.Г. Васильев<sup>1,2</sup>, А.Е. Родниченко<sup>1,2</sup>, С.С. Страфун<sup>4</sup>, О.А. Костогрыз<sup>4</sup>, А.Т. Бруско<sup>4</sup>, Л.И. Остапченко<sup>2</sup>, А.В. Курмышов<sup>3</sup>

1. ГУ "Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины", Киев, Украина
2. НОЦ "Институт биологии" Киевского национального университета имени Тараса Шевченко, Киев, Украина
3. Биотехнологическая лаборатория *ilaya regeneration*, Медицинская компания *ilaya*, Киев, Украина
4. ГУ "Институт травматологии и ортопедии НАМН Украины", Киев, Украина

**Целью** исследования являлось создание стандартизированных технологий изоляции и культивирования хондроцитов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) для потенциального клинического применения при повреждениях хряща у животных и человека.

**Методы исследования:** культура клеток, спектрофотометрический, гистохимический, цитохимический, КОЕ-анализ и кинетика роста клеточной популяции; микроскопия в проходящем свете, проточная цитофлуорометрия, экспериментальное моделирование, статистические.

**Результаты и обсуждение:** в ходе исследования оптимизированы технологии выделения и культивирования ММСК из жировой ткани (ММСК-ЖТ) и хондроцитов пульпозного ядра (ХЦПЯ) межпозвоночного диска человека. Эффективным ферментом для изоляции оказался 0,2% раствор коллагеназы IA. ММСК-ЖТ имели фенотип CD90<sup>+</sup>/CD73<sup>hi</sup>/CD105<sup>hi</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>, а ХЦПЯ - CD90<sup>hi</sup>/CD73<sup>hi</sup>/CD105<sup>+</sup>/CD44<sup>hi</sup>/CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>. Оба клеточных типа успешно дифференцировались по трем ортодоксальным направлениям - остеогенному, адипогенному и хондрогенному.

Показано, что при раздельном и совместном культивировании ММСК-ЖТ и ХЦПЯ наиболее активно пролиферировали ММСК-ЖТ, наименее - ХЦПЯ. В группе кокультивируемых клеток наблюдали средний темп пролиферации. Культуры ММСК-ЖТ и ХЦПЯ активно пролиферируют в ростовой среде с добавлением гомологичных донорских АВ-сыворотки и АВ-тромбоцитарного лизата человека. Выявлено увеличение темпов пролиферации клеточных культур обоих типов при низкокислородном культивировании (5% O<sub>2</sub>).

Вторым этапом явилось исследование влияния трансплантации культивированных аллогенных суставных хондроцитов в 2% агарозном гидрогеле на заживление моделированных острых полнослойных дефектов суставного хряща у беспородных собак (исследование одобрено Комиссией по вопросам биоэтики при КНУ им. Тараса Шевченко). Патогистологический анализ тканей коленных суставов собак с моделированными полнослойными хрящевыми дефектами суставных поверхностей межмышечковой борозды показал, что через три месяца дефект был полностью заполнен, носитель не наблюдался, четко определялась латеральная интеграция регенерата с прилегающими донорскими тканями с наличием гиперцелюлярных кластеров в краевых зонах. Характерными признаками образовавшегося регенерата после трансплантации культивированных хондроцитов в агарозном гидрогеле являлись его незрелость, наличие смеси фиброзной соединительной ткани и фиброзного хряща с островками хондроида. Подобная патогистоморфологическая картина соответствует ранним стадиям репарации суставного хряща у собак сроком до трех месяцев.

## Оценка выживания мезенхимальных стволовых клеток при разных способах введения

Калашникова М.В., Брутер А.В., Белявский А.В.

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Для оценки перспектив использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в клеточной и генной терапии необходимо знать, какова судьба трансплантированных клеток в организме и какая их часть способна долгое время сохраняться в организме. В данной работе мы исследовали степень пост-трансплантационного сохранения МСК в различных тканях у мышей в течение сорока дней.

МСК жировой ткани мыши, стабильно секретирующие маркерный белок щелочную фосфатазу SEAP, получали с помощью трансдукции лентивирусным вектором pLego-mSEAP. По 1,5 млн таких клеток вводили сингенно мышам линии C57BL6. Применялось как системное введение - инъекция в хвостовую вену, так и локальная трансплантация - инъекции в брюшную полость, под кожу и в мышцы задних конечностей. Часть клеток перед трансплантацией была обработана митомицином для остановки их деления. Уровень содержания SEAP в сыворотке крови оценивали с помощью набора Phospha-Light System AB. Измеряли также уровень эндогенной экспрессии фосфатазы у интактных животных.

Динамика сигнала щелочной фосфатазы у животных, которым клетки были введены внутривенно существенно отличалась от таковой для трех других групп животных. При системном введении происходило быстрое падение сигнала: на четвертый день он уменьшался примерно вдвое по сравнению с первым днем, а через неделю составлял около 10% от исходного. После десятого дня резкое падение прекращалось, и к концу эксперимента сигнал держался на уровне 1,5 %, превышая эндогенный уровень фосфатазы более чем в 2 раза.

При введении клеток в мышцы нижних конечностей и под кожу, напротив, сигнал через 3-4 дня после введения превышал сигнал первого дня в 1,5 – 5 раз. Данный скачок присутствовал и у животных, в которых вводили МСК, обработанные митомицином. Через неделю после трансплантации уровни сигналов фосфатазы возвращались примерно к исходному сигналу. После 10-го дня, как и при системном введении, происходила стабилизация сигнала. Для животных с обработанными митомицином МСК сигнал падал до уровня фоновых значений. К концу опыта сигнал щелочной фосфатазы составлял примерно 20-40% от исходного сигнала при внутримышечном введении клеток и 20% при подкожном. При введении клеток в брюшную полость на 4 день после введения сигнал увеличивался незначительно, а к концу эксперимента снижался примерно до 7% от исходного.

Таким образом, трансплантированные МСК выживают наилучшим образом, и, возможно, локально интегрируются в ткани, при их введении в скелетные мышцы и подкожно. При этом значительное их число сохраняется в организме не менее 40 дней. Рост сигнала фосфатазы на 3-4 сутки, по всей вероятности, связан с постепенным накоплением маркерного белка в крови, а не с размножением клеток. При системном введении МСК, подавляющее большинство их, о чем свидетельствуют литературные и наши собственные данные, задерживается в легких. Результаты данной работы впервые показали, что задержанные в легких клетки впоследствии в основном не перераспределяются в другие органы и ткани, а погибают. Системная трансплантация МСК, таким образом, малоэффективна, и более перспективной является локальная доставка клеток к месту повреждения вследствие их более высокой выживаемости и ретенции в тканях.

## **Внутриклеточная регенерация кальция – транспортирующей системы кардиомиоцитов при remodelировании миокарда как условие сохранения их функциональной состоятельности**

Кондратьева Д.С., Афанасьев С.А., Егорова М.В., Козлов Б.Н., Попов С.В.

*ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН, Томск, Россия*

Восстановление адекватной сократительной функции сердечной мышцы при постинфарктном remodelировании связано как с органоспецифической регенерацией, так и с адаптивными структурными и функциональными перестройками сохраненных кардиомиоцитов. В этих условиях благоприятный исход для нормальной сократительной функции сердца может быть связан с сохранением и восстановлением процессов электромеханического сопряжения кардиомиоцитов, а также их энергетической обеспеченностью. В связи с этим, целью исследования было изучение функционального состояния кальция-транспортирующих систем саркоплазматического ретикулума (СР), а также уровня энергетического метаболизма в условиях постинфарктного remodelирования миокарда.

**Методы.** Работа выполнена на биопсийном материале предсердия 27 пациентов, из них 14 (1 группа) имели диагноз сердечная недостаточность (III-IV функциональный класс по NYHA), а 13 (2 группа) имели сердечную недостаточность (III-IV функциональный класс по NYHA) сочетанную с сахарным диабетом II типа. Всем пациентам было показано коронарное шунтирование. Функциональный резерв миокарда оценивали по ритмоинотропному ответу сердечной мышцы на изменение режимов стимуляции. Уровень Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы в биопсийном материале миокарда пациентов определяли при помощи Вестерн блоттинга. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), сукцинатдегидрогеназы (СДГ) определяли с помощью гистохимических методов. Интенсивность дыхания митохондрий оценивалась по скорости поглощения кислорода митохондриями при помощи электрода Кларка. Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Манна-Уитни.

**Результаты.** Исследование показало, что при постинфарктном remodelировании миокарда, как на фоне сахарного диабета, так и без него, функциональный резерв кардиомиоцитов либо сохраняется на высоком уровне, либо имеет низкий статус. При этом в первом случае наблюдался более высокий уровень экспрессии Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы СР. При сохранении более высокого уровня функционального резерва у пациентов с СДII восстановление электромеханического сопряжения происходит более благоприятно. У пациентов с низким функциональным резервом кардиомиоцитов не зависимо от группы, экспрессия Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы СР имела более низкий уровень, чем у пациентов с высоким функциональным резервом. При этом не было обнаружено различий внутри групп ни по активности метаболических ферментов, ни по скорости поглощения кислорода кардиомиоцитов. У пациентов с постинфарктным remodelированием миокарда активность ЛДГ и СДГ была выше, чем у пациентов с СДII. Вместе с тем, уровень окислительного фосфорилирования был выше у пациентов с сочетанным развитием патологий.

**Заключение.** Сохранение функционального резерва кардиомиоцитов при постинфарктном remodelировании миокарда во многом определяется восстановлением уровня Ca<sup>2+</sup>-АТФ-азы СР кардиомиоцитов. Эффективность процессов восстановления обеспечивается адекватностью энергетического метаболизма клетки, который в случае сочетанного развития ИБС и сахарного диабета обеспечивается за счет преобладания процессов окислительного фосфорилирования.



## **Радиочувствительность адипоцитов и хондроцитов, полученных из культуры костномозговых мезенхимальных стволовых клеток человека**

Конопляников А.Г., Носаченко В.В., Кальсина С.Ш., Конопляников М.А.

*ФГБУ Медицинский радиологический научный центр Минздрава России, Обнинск, Россия*

*Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, Москва, Россия*

Путем культивирования костномозговых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в специфических средах, определяющих их дифференцировку в направлении адипоцитов и хондроцитов, были получены ранние культуры этих клеток, которые были подвергнуты гамма-облучению в дозах 3, 6, 9 и 12 Гр. Было обнаружено, что в этом случае наблюдается ранее обнаруженная нами закономерность, проявляющаяся в том, что при выращивании из культур МСК клеток, направленных в дифференцировку в направлении кардиомиоцитов и названных нами кардиомиобластами, такие частично дифференцированные МСК обладают повышенной радиорезистентностью при сравнении их с исходными культурами МСК. В данном случае две новые дифференцировки МСК также приводили к получению более радиорезистентных клеток, чем исходные МСК.

Можно предположить, что для МСК начало дифференцировочных процессов активирует некие репаративные механизмы в клетках, которые, как принято считать, связаны с репарацией повреждений генетического материала клеток (такие процессы как репарация одиночных и двойных разрывов ДНК, репарация ДНК-мембранного комплекса и др.). Хотя природа такой радиорезистентности остается неясной, мы планируем получить некоторые новые данные по этому вопросу подвергнув МСК и их частично дифференцированное клеточное потомство воздействию плотноионизирующей радиации, при воздействии которой репаративные процессы существенно ослабляются. Если в этом случае существенных различий в радиорезистентности плюрипотентных и частично дифференцированных МСК не будет выявлено, то можно будет рассматривать наше предположение как более обоснованное. Если же такие различия останутся придется искать другие объяснения изменениям радиорезистентности МСК в процессе их дифференцировки.

## **Увеличение эффективности скелетно-мышечного перепрограммирования при помощи транзientной экспрессии оптимизированных транскрипционных факторов миогенеза**

Копанцева, Е.Е., Белявский, А.В.

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН, Москва, Россия*

Перепрограммирование соматических стволовых клеток – перспективное направление клеточной терапии, позволяющее генетически модифицировать аутологичные стволовые клетки для последующей трансплантации их пациенту. Для области скелетно-мышечного перепрограммирования на сегодняшний день все еще актуальна проблема эффективности и клинической безопасности. Эффективность перепрограммирования соматических стволовых клеток в скелетно-мышечные миоциты при помощи дифференцировочной клеточной среды достаточно низкая. Вирусная трансдукция генетических конструкций, содержащих мастер-гены миогенного развития, увеличивает индукцию перепрограммирования, но не применима на клиническом уровне.

Наша группа исследует процесс перепрограммирования мезенхимальных стволовых клеток крысы при помощи транзientной экспрессии плазмидных конструкций, содержащих кДНК факторов, релевантных для скелетно-мышечного развития. Нам удалось достигнуть экспрессии маркеров миогенеза (миогенин, десмин, тропонин I, тяжелые цепи миозина) при помощи трансфекции конструкции, содержащей ген транскрипционного фактора MyoD. Далее, мы поставили целью повышение активности MyoD как транскрипционного фактора. Для этого мы создали гибридные конструкции, в которых ген MyoD совмещался с активационными доменами транскрипционных факторов Nf-KB и VP-16. Трансфекция конструкции рMyoD-NfKBAD в МСК привела к увеличению уровня индукции скелетно-мышечных маркеров как на уровне РНК, так и на уровне белка, по сравнению с трансфекцией рMyoD. В то же время, трансфекция рMyoD-VP16AD не дала увеличения индукции перепрограммирования, по сравнению с трансфекцией рMyoD.

Таким образом, нами было показано увеличение эффективности миогенной индукции путем транзientной экспрессии гибридного белка, созданного на основе транскрипционного фактора миогенеза MyoD.

# Разработка методов трехмерного культивирования мышечной биомассы

Коровина Д.Г.<sup>1</sup>, Артамонова М.П.<sup>2</sup>

1. ФГБОУ ВПО Московский государственный университет пищевых производств, Москва, Россия
2. ГНУ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко Россельхозакадемии, Москва, Россия

Выращивание мышечной ткани *in vitro* является новым перспективным направлением альтернативного производства мяса и получения полноценного животного белка.

На сегодняшний день с помощью методов тканевой инженерии была создана биомасса, состоящая из клеток мышечной ткани крупного рогатого скота (КРС), полученной путем культивирования и направленной дифференцировки мультипотентных мезенхимных стволовых клеток (ММСК), выделенных из костного мозга (КМ) и жировой ткани (ЖТ) взрослых особей сельскохозяйственных животных [1]. В развитие полученных результатов проводятся исследования возможности выращивания мышечной биомассы в трехмерных условиях в миогенной среде с применением инертных полистериновых и белковых матриц, представленных коллагеном I-го типа и желатином. Данные матрицы предоставляют механическую прочность конструкции и обеспечивают трехмерное ориентирование нанесенной на них клеточной культуры.

Для проведения экспериментов по трехмерному культивированию и миодифференцировке ММСК КРС используется среда DMEM с низким содержанием глюкозы (1 г/л), дополненная 10%-ми сыворотки плодов коров и антибиотиками, в качестве индуктора используется ретиноевая кислота.

Для гистологического анализа сформированной 3D клеточной структуры используется быстрый метод замораживания ткани и генерации образцов (криосрезов). Образцы матриц толщиной 200 мкм пропитываются криозащитной средой для тканей и помещаются в жидкий азот на 10 минут, после чего хранятся при температуре -80 °С в течение 24 часов. Изготовление срезов толщиной 10 мкм осуществляется на микротоме-криостате, зафиксированные ледяным метанолом в течение 15 минут образцы окрашиваются гематоксилином и эозином.

Полученные предварительные данные демонстрируют перспективность дальнейшего использования ММСК в трехмерном *in vitro* моделировании мышечной ткани с целью дальнейшего ее использования при составлении пищевых композиций заданного состава и качества.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Рогов, И.А. Мясо *in vitro* как перспективный источник полноценного белка/ И.А. Рогов, А.Б. Лисицын, К.Г. Таранова, И.М. Волкова// Все о мясе. - 2013. -№4. - С. 28-31.

## **Нарушение экспрессии РНК хеликазы Belle приводит к исчезновению герминальных стволовых клеток**

Котов А., Кибанов М., Оленкина О., Оленина Л.Ткачук В.А. , Колесников С.С.

*ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

Данная работа посвящена изучению роли РНК хеликазы Belle в поддержании и дифференцировке герминальных стволовых клеток в процессе сперматогенеза у *Drosophila*. Нарушение экспрессии белка DBY у человека, который является гомологом Belle, ассоциировано с Sertoli cell-only синдромом (SCOS) и с гипосперматогенезом (Foresta et al., 2000; Lardone et al., 2007).

Мы исследовали семенники взрослых мух несущих мутацию в гене *belle* с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии и нашли в них значительные фенотипические отклонения от нормы. Семенники таких мух были значительно редуцированы в размере, а герминальные клетки, в том числе и стволовые, почти полностью отсутствовали. В то же время соматические клетки цисты не имели нарушений, а соматические клетки хаба были найдены оверпролиферированными. Использование трансгенной RNAi конструкции, специфичной к последовательности *belle*, под контролем герминального промотора позволило получить мух с нарушением экспрессии Belle исключительно в герминальных клетках. В таких семенниках, по сравнению с контрольными, мы наблюдали сохранение и гиперэкспрессию соматических клеток, массовую потерю герминальных клеток, а также герминальные клетки с нарушенной морфологией, подвергающиеся апоптозу на всех предмейотических стадиях развития. Следовательно, функция Belle необходима внутриклеточно для поддержания герминальных клеток семенника на ранних стадиях сперматогенеза.

Иммунофлуоресцентное окрашивание семенников личинок показало, однако, что закладка герминальных тканей у мутантов *belle* проходит нормально. Однако уже на ранних стадиях сперматогенеза наблюдаются герминальные клетки с аномально большим размером. Мы предположили, что это связано с задержкой в G2/M фазовом переходе и нарушением регуляции митоза. Для проверки этой гипотезы мы проанализировали при помощи Вестерн блот анализа уровень экспрессии митотических циклинов – Cyclin A и Cyclin B, которые необходимы для входа и прохождения митоза. Нами было обнаружено значительное снижение уровня экспрессии циклинов на фоне мутации *belle* в яичниках, где герминальные клетки сохраняются на фоне мутации. Мы полагаем, что РНК-хеликаза Belle вовлечена в посттранскрипционную регуляцию экспрессии митотических циклинов. Мутация вызывает резкое снижение их дозы в митотически-активных клетках семенника, арест на стадии входа в митоз и последующий апоптоз.

Таким образом, функция Belle критически необходима внутренне для поддержания и самообновления стволовых герминальных клеток, а так же пролиферации сперматогониев в раннем сперматогенезе *Drosophila*. Эта ситуация схожа с Sertoli cell-only синдромом у человека, где на фоне делеции гена DBY также наблюдается потеря герминальных клеток при сохранении соматических клеток семенника, клеток Сертоли. По-видимому, общий молекулярно-биологический механизм лежит в основе вызываемых нарушений у человека и *Drosophila*.

Эта работа была поддержана грантом программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и грантом РФФИ № 13-04-00699.

# Механизмы генерации $\text{Ca}^{2+}$ ответов на норадреналин мезенхимальными стромальными клетками человека

Котова П.Д.<sup>1</sup>, Фадеева Ю.И.<sup>2</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>2</sup>, Рогачевская О.А.<sup>1</sup>, Сысоева В.А.<sup>2</sup>, Ткачук В.А.<sup>2</sup>, Колесников С.С.<sup>1</sup>

1. ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

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

Рецепторные и сигнальные системы мезенхимальных стволовых клеток человека на данный момент недостаточно изучены. Между тем, анализ организации этих систем на молекулярном и функциональном уровнях необходим для понимания биологических функций стволовых клеток и физиологических процессов, протекающих в них. Стволовые клетки выделялись из жировой ткани, полученной при плановых операциях. Эти мезенхимальные стромальные клетки (МСК), поддерживались в культуре и физиологические процессы в них анализировались с использованием микрофотометрии, ингибиторного анализа и  $\text{Ca}^{2+}$  зондов. Оказалось, что популяция МСК гетерогенна по чувствительности к различным агонистам рецепторов. В частности популяция МСК содержала субпопуляцию (3-5%) клеток, специфически отвечающих на норадреналин мобилизацией внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . В данной работе мы фокусировались на исследовании адренергической сигнальной системы.

Использование агонистов и антагонистов, специфических для  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - и  $\beta$ -адренорецепторов, позволило установить, что ответы на норадреналин генерируются МСК преимущественно при участии  $\alpha_2$ -адренорецепторов. В условиях отсутствия внешнего  $\text{Ca}^{2+}$  МСК генерировали нормальные или несколько уменьшенные по амплитуде  $\text{Ca}^{2+}$  ответы. Это указывало на то, что ответы клеток генерировались преимущественно за счет выброса депонированного  $\text{Ca}^{2+}$ . Ингибитор фосфолипазы С полностью подавлял ответы на норадреналин, что свидетельствует о сопряжении  $\alpha_2$ -адренорецепторов с фосфолипазой С. Последняя гидролизует  $\text{PIP}_2$  до  $\text{IP}_3$  и  $\text{DAG}$  с последующей стимуляцией  $\text{IP}_3$  рецепторов, о чем свидетельствуют эксперименты с ингибиторами рианодиновых и  $\text{IP}_3$  рецепторов.

Интересной особенностью исследовавшейся сигнальной системы было то, что амплитуда ответов не зависела от концентрации норадреналина. Мы предположили, что адренергические МСК используют дополнительный механизм усиления в виде кальций-индуцированного выброса  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо ( $\text{Ca}^{2+}$ -induced  $\text{Ca}^{2+}$  release, CICR). В этом случае первоначальное повышение уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , зависимое от концентрации агониста, должно было бы стимулировать масштабный выброс кальция из внутриклеточных депо, что и могло бы продуцировать вторичный  $\text{Ca}^{2+}$  ответ, независимый от концентрации агониста. Эта идея проверялась в экспериментах, где скачкообразное повышение внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , осуществлялось за счет фотоллиза фоточувствительного  $\text{Ca}^{2+}$  хелатора  $\text{NDP-EGTA}$ . Кинетически и по амплитуде ответы МСК на вспышки света 355 нм, инициировавшего только скачки внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , были идентичны ответам клеток на норадреналин. Таким образом, адренорецепторы в МСК сопряжены с фосфоинозитидным каскадом и механизмом CICR.

## Циркулирующие ангиогенные факторы, ассоциированные с постинфарктной сердечной недостаточностью и метаболическими нарушениями

Кочегура Т.Н.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>1</sup>, Овчинников А.Г.<sup>2</sup>, Жигунова Л.В.<sup>2</sup>, Лахова Е.Л.<sup>2</sup>, Масенко В.П.<sup>2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>, Агеев Ф.Т.<sup>2</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. НИИ кардиологии имени А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Неотъемлемой составляющей ишемической болезни сердца (ИБС), хронической сердечной недостаточности (ХСН), СД2 (сахарного диабета 2 типа), во многом определяющей прогноз, является компенсаторный ангиогенез, который детерминирован рядом факторов, в том числе, ангиогенных факторов роста.

**Цель исследования:** Оценить уровень ангиогенных факторов в плазме больных с постинфарктной ХСН, в том числе при ее сочетании с СД2, сопоставить с тяжестью состояния.

**Методы:** В исследование включены 100 пациентов: 20 относительно здоровых добровольцев, 30 больных с постинфарктной ХСН, 24 больных с ХСН, сочетающейся с СД2, (ХСН+СД2) и 26 больных с СД 2 типа без ХСН. Количественное определение циркулирующих фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и ангиопоэтина-1 выполнялось методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы R&D Systems (США).

**Результаты:** При оценке уровня HGF было выявлено, что наименьшее его количество у лиц контрольной группы и больных с ХСН без СД2, а наибольшее содержание у больных с ХСН+СД2. В группе с ХСН+СД2 уровень HGF коррелирует со степенью компенсации углеводного обмена. В подгруппах больных с ХСН+СД2/комп./субкомп. (HbA1c=6,72±0,41%) и ХСН+СД2/декомп. (HbA1c=9,26±1,79%), уровни HGF составляли 530.9 [499.6-725.5] пг/мл vs 869.9 [760.2-1007.5] пг/мл, соответственно,  $p=0.02$ ). В объединенной группе больных уровень HGF прямо коррелирует с ИМТ ( $r=0.38$ ,  $p=0.0006$ ), с уровнем глюкозы ( $r=0.35$ ,  $p=0.001$ ), HbA1c ( $r=0.49$ ,  $p<0.0001$ ), а также с такими маркерами неблагоприятного прогноза, как концентрацией мочевины и  $hsCRP$  ( $r=0.43$ ,  $p=0.042$  и  $r=0.32$ ,  $p=0.011$ , соответственно). Выявлены корреляции между уровнем HGF и показателями тяжести ХСН, такими как концентрация NT-proBNP, (N-terminal pro B-type natriuretic peptide), ( $r=0.55$ ,  $p<0.0001$ ), MR-proANP, (midregional pro-atrial natriuretic peptide ( $r=0.33$ ,  $p=0.002$ )). При оценке VEGF было обнаружено повышение его уровня у больных всех групп по сравнению с группой контроля. Наибольший уровень VEGF наблюдался у больных с ХСН+СД2 и больных с СД2 без ХСН. В объединенной группе всех больных выявлены корреляции VEGF с уровнем  $hsCRP$  ( $r=0.23$ ,  $p=0.05$ ), триглицеридов ( $r=0.39$ ,  $p=0.0009$ ), с уровнем HGF ( $r=0.25$ ,  $p=0.01$ ), с уровнем NT-proBNP ( $r=0.27$ ,  $p=0.011$ ). При оценке циркулирующего ангиопоэтина-1 также было отмечено повышение его уровня у больных всех групп по сравнению с группой контроля, однако выявленные различия не достигали статистической значимости.

**Выводы:** Повышение циркулирующих уровней ангиогенных факторов ассоциируется с ХСН, в том числе при ее сочетании с СД2. Исследованные ангиогенные факторы могут являться кандидатными биомаркерами тяжести ИБС и неблагоприятного прогноза при ХСН, сочетающейся с метаболическими расстройствами (СД2 и ожирением), что требует подтверждения в проспективных исследованиях.

## Циркулирующий уровень эндотелина-1 у больных с систолической сердечной недостаточностью коррелирует со степенью диастолической дисфункции и сахарным диабетом 2 типа

Кочегура Т.Н.<sup>1</sup>, Макаревич П.И.<sup>1</sup>, Овчинников А.Г.<sup>2</sup>, Жигунова Л.В.<sup>2</sup>, Лахова Е.Л.<sup>2</sup>, Масенко В.П.<sup>2</sup>, Парфенова Е.В.<sup>1,2</sup>, Агеев Ф.Т.<sup>2</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. НИИ кардиологии имени А.Л. Мясникова, ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Минздрава России, Москва, Россия

Эндотелин-1 (ЭТ-1) синтезируется эндотелиальными клетками, проявляет митогенные, вазоконстрикторные свойства, модулирует инотропный эффект и стимулирует гипертрофию миокарда.

**Цель исследования:** Оценить уровень циркулирующего ЭТ-1 в плазме больных с постинфарктной систолической хронической сердечной недостаточностью (ХСН), в том числе при ее сочетании с сахарным диабетом (СД2) и сопоставить с уровнем N-terminal pro B-type natriuretic peptide, (NT-proBNP) и ЭХО-КГ параметрами.

**Методы:** В исследование включены 75 пациентов, которые были распределены в 3 группы: 20 относительно здоровых добровольцев, 30 больных с постинфарктной ХСН, 25 больных с ХСН, сочетающейся с СД2, (ХСН+СД2). Протокол исследования включал рутинное клинико-лабораторное обследование, ЭХО-КГ, а также количественное определение ЭТ-1 методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов фирмы R&D Systems (США).

**Результаты:** Выявлено, что у больных с ХСН+СД2 уровень циркулирующего ЭТ-1 выше, чем у больных с ХСН без СД2 (794 пг/мл [567; 1142] vs 487 пг/мл [423; 629],  $p=0.0005$ ) и здоровых добровольцев (432 пг/мл [358; 543],  $p=0.0001$ ). В объединенной группе больных обнаружены корреляции между уровнем ЭТ-1 и уровнем NT-proBNP ( $r=0.38$ ,  $p=0.0002$ ), конечно-диастолическим объемом ЛЖ ( $r=0.32$ ,  $p=0.008$ ), соотношением максимальных скоростей раннего и позднего наполнения Е/А ( $r=0.47$ ,  $p<0.0001$ ), временем изоволюметрического расслабления ЛЖ ( $r=-0.30$ ;  $p=0.015$ ), фракцией выброса ЛЖ ( $r=-0.27$ ,  $p=0.025$ ). Циркулирующий уровень ЭТ-1 был выше у больных с ХСН и средней/тяжелой степенью ДД ЛЖ (II-III ст.) по сравнению с больными с ХСН и умеренной степенью ДД ЛЖ (I ст.) и составлял (814 пг/мл [618; 1203] vs 543 пг/мл [462; 704], соответственно,  $p<0.0001$ ).

**Выводы:** Циркулирующий Эндотелин-1 у больных с систолической ХСН и ее сочетании с СД2 может быть кандидатным биомаркером диастолической дисфункции, что должно быть проверено в проспективных исследованиях.

## Протокол децеллюляризации легких крысы для создания тканеинженерного каркаса

Куевда Е.В.<sup>1</sup>, Губарева Е.А.<sup>1</sup>, Сотниченко А.С.<sup>1</sup>, Гилевич И.В.<sup>1</sup>, Попова А.В.<sup>1</sup>, Юнгеблут Ф.<sup>2</sup>, Хааг И.<sup>2</sup>, Крашенинников С.В.<sup>3</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>3</sup>, Чвалун С.Н.<sup>3</sup>, Маккиарини П.<sup>1,2</sup>

1. Кубанский государственный медицинский университет, Международный научно-исследовательский клинично-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия
2. Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция
3. Курчатовский НБИКС-центр НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

Целью исследования явилась оптимизация протоколов децеллюляризации легких крысы при использовании ионных и неионных детергентов под контролем параметров вентиляции легких.

**Материалы и методы.** В экспериментальное исследование были включены восемнадцать крыс-самцов линии Lewis в возрасте более 1 года, весом  $180 \pm 16$  г. Децеллюляризация проводилась в биореакторе, созданном для мелких животных, с использованием различных комбинаций вентиляции легких атмосферным воздухом и перфузии сосудов детергентами. Основными используемыми сочетаниями вышеупомянутых методов были: а) вентиляция легких через трахею и ретроградная перфузия через аорту; в) вентиляция легких через трахею и антеградная перфузия через легочную артерию; с) перфузия сосудистого русла без одномоментной вентиляции. Эффективность проведенной децеллюляризации легких оценивалась путем морфологического анализа с использованием рутинных методов гистологической окраски гематоксилином и эозином, трехцветным Мэсон, окрашиванием эластических волокон по Ван-Гизону. Также проводилось иммуногистохимическое исследование (ИГХ) нативных органов и децеллюляризованных каркасов на содержание коллагена I и IV типов, ламинина, эластина, фибронектина; количественное определение ДНК в децеллюляризованной ткани; колориметрический анализ (ХТТ-тест); сканирующая электронная микроскопия (СЭМ).

**Результаты.** Окрашивание гематоксилином и эозином легких, децеллюляризованных по протоколу, сочетающему вентиляцию и антеградную перфузию легочной артерии ионными и неионными детергентами невысокой концентрации, выявило полное отсутствие клеточных элементов, при этом структура внеклеточного матрикса была сохранена. ИГХ окрашивание подтвердило сохранность основных белков внеклеточного матрикса. При количественном определении уровня ДНК в децеллюляризованных образцах установлено, что около 92% ядерного материала было удалено в процессе децеллюляризации. При биомеханическом тестировании легких крысы продемонстрировано, что механические характеристики децеллюляризованных образцов соответствовали нативным органам.

**Выводы.** Использование протокола децеллюляризации легких, сочетающего антеградную перфузию легочной артерии и вентиляцию трахеи атмосферным воздухом, обеспечивает получение внеклеточного матрикса морфологически похожего на матрикс нативного органа, что представляет интерес для создания тканеинженерных легких в будущем.



# Анализ динамики изменения морфофункционального состояния интерфазного хроматина мезенхимальных стволовых клеток при действии ФГА и преднизолона

Кузнецов А.Б.<sup>2,3</sup>, Юсуфов М.И.<sup>1</sup>, Беляков В.К.<sup>2,3</sup>

1. Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
2. ГОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им.Н.И. Пирогова, Москва, Россия
3. ООО «Вестрэйд ЛТД», Москва, Россия

Известно, что активация клетки приводит к целому комплексу событий, происходящих с клеткой в целом, а также затрагивающим ее ядро. Интерфазный хроматин клеток специфическим образом реагирует на такие активирующие воздействия. Ранее нами было установлено, что при активации лимфоцита ядро клетки увеличивается в своих размерах, хроматин разуплотняется, становится более рыхлым, как следствие уменьшения анизотропии снижается фазовая высота, регистрируемая методом когерентно-фазовой микроскопии. Особое значение реактивность интерфазного хроматина имеет при изучении процессов дифференцировки стволовых клеток *in vitro* для последующей их трансплантации. В данном исследовании предлагается новый подход на основе анализа интерфазного хроматина без дополнительной фиксации и окраски клеток, метод сегментации и цифровой обработки изображений интерфазных ядер стволовых клеток. Метод сегментации и цифровой обработки изображений интерфазных ядер позволяет определить и охарактеризовать взаимное расположение участков хроматина с отличающейся плотностью. При этом определяются расстояния между центрами сегментов (относительное расстояние) и относительная плотность каждого сегмента. Относительная плотность сегмента – это величина, равная отношению оптической плотности сегмента к максимальной оптической плотности хроматина конкретного ядра. Данная величина характеризует степень упаковки хроматина, чем ниже ее значение, тем ниже плотность, тем хроматин менее компактизован (более рыхлый) в данной области ядра. Предполагается, что оптическая плотность в каждой точке изображения пропорциональна плотности вещества.

**Материалы и методы:** исследование проводили на мезенхимальных стволовых клетках (МСК) человека, источником являлся костный мозг; для активации клеток применяли ФГА и преднизолон в концентрации 100 мкг/мл в фосфатном буфере, анализ оптических свойств ядерного хроматина клеток осуществляли методом сегментации и цифровой обработки изображений, регистрацию сигнала проводили в проходящем свете конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 710 при длине волны лазера 405 нм, в качестве референсного метода проводили FISH детекцию центромер 1-ой и 18-ой хромосом.

**Результаты:** В результате проведенных исследований было установлено изменение морфофункционального состояния интерфазного хроматина МСК, после воздействия ФГА и преднизолона. При цифровой сегментации изображений ядер клеток, подвергнутых действию ФГА в течение 1 часа, обнаруживается достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение количества сегментов в ядре. Относительное расстояние между центрами сегментов в ядрах МСК при действии ФГА достоверно меньше, чем для интактных клеток. При этом средняя относительная плотность, характеризующая общее состояние хроматина (уровень конденсации) не отличается от таковой для интактных клеток. Это может свидетельствовать о перестройках в организации хроматина активированных ФГА клеток. При анализе действия преднизолона на МСК установлено, что средняя относительная плотность хроматина ядер таких клеток достоверно выше, чем для интактных МСК и клеток, подвергнутых воздействию ФГА. При этом количество сегментов в ядрах и расстояния между их центрами не отличается от таковых показателей для интактных клеток. Для интактных клеток расположение сегментов рыхлого хроматина наиболее вероятно встречается ближе к периферии ядер, а для клеток, активированных ФГА и преднизолоном это расположение ближе к центру, что, вероятнее всего, связано с перемещением активного наименее конденсированного (более рыхлого) хроматина от периферии ядра к центру при действии преднизолона и ФГА на клетки.

---

Одновременно с этим при действии ФГА и преднизолона методом FISH было зарегистрировано смещение центромерных последовательностей 1-ой и 18-ой хромосом относительно центра ядра достоверно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с интактными клетками. Наибольшее увеличение расстояний между сигналами наблюдалось при действии ФГА для 18-хромосомы, преднизолон оказал действие на изменение расстояний между сигналами 1-ой хромосомы. Было выявлено увеличение радиального радиуса расположения сигналов 1-ой хромосомы при действии преднизолона, что не наблюдалось для центромерных сигналов 18й хромосомы, сигналы синхронно переместились от центра ядер, при этом отдаляясь друг от друга без изменения угла между ними. В случае действия ФГА, между сигналами 1-ой хромосомы меняется только угол, что может свидетельствовать о перемещении одного из сигналов относительно другого по окружности, центром которой является один из сигналов. Отмечено также достоверное изменение расстояний между сигналами 1-ой и 18-ой хромосом как при действии ФГА, так и при действии преднизолона, при сравнении с интактными клетками.

**Заключение:** Методом сегментации и цифровой обработки изображений интерфазных ядер МСК было установлено, что при действии факторов активации (ФГА и преднизолон) наблюдается динамическая реорганизация морфофункциональной архитектуры интерфазного хроматина в виде изменения характера распределения его плотности по ядру, локального перемещения менее плотных участков хроматина к центру ядра, в подтверждении этому методом FISH при этом было показано изменение расположения центромер 1-ой и 18-ой хромосом относительно центра и друг друга. Предложенный метод сегментации и цифровой обработки изображений ядер позволяет проанализировать состояние интерфазного хроматина и клетки в целом без дополнительных методов окрашивания и фиксирования, что делает возможным дальнейшее использование и изучение этих живых не модифицированных клеток.

## **Разработка биологически активных материалов на основе коллагена для замещения тканевых дефектов**

Кулакова К.В., Бугров С.Н., Алейник Д.Я., Стручков А.А.

*ФГБУ «Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия*

В настоящее время для местного лечения ран применяются различные варианты заменителей кожи на основе коллагена. Современной тенденцией является создание комбинированных биологически активных перевязочных средств, содержащих стимуляторы регенерации, включая культивированные клетки, в сочетании с различными антибактериальными средствами, антиоксидантами, пролонгированно десорбируемыми в рану в необходимой дозировке. В рамках создания подобного заменителя кожи нами было разработано раневое покрытие, представляющее собой двухслойную гетерогенную мембрану, которая в силу особенностей своей структуры может включать широкий спектр биологически активных веществ. В базовом варианте запатентованный коллективом авторов материал состоит из коллагенового и полисахаридного компонентов. Нейтральный коллаген выделяется по оригинальной методике из ксеногенной дермы. Коллагеновый слой покрытия может быть импрегнирован мелкодисперсным ксеногенным деминерализованным костным матриксом (ДКМ). Выбор компонентов обусловлен их способностью оказывать влияние на процессы регенерации в зоне дефекта. Аморфный дермальный коллаген III типа является депо для построения собственных коллагеновых волокон, в то время как ДКМ представляет собой структурированный коллаген I типа, и в силу этого может служить эффективным носителем различных биологически активных веществ. Полисахаридный (агаровый) слой покрытия изолирует раневую поверхность от внешней среды и обеспечивает покрытие необходимыми физическими свойствами (прочность, эластичность, адгезивные и адсорбционные свойства, проницаемость для жидкости и газов). В зависимости от области применения в базовый вариант материала могут вводиться антибактериальные средства, либо культивируемые клетки.

На первом этапе ранозаживляющие свойства коллагенового раневого покрытия с ДКМ, риванолом и гентамицином изучали в экспериментах *in vivo* (120 белых нелинейных крыс) на модели полнослойной скальпированной раны. В результате было показано, что применение разработанного коллагенового материала приводит к ускорению процесса регенерации, что сопровождается сокращением сроков эпителизации раны по сравнению с контролем (спонтанно заживающими ранами). Отличия между опытной и контрольной группой животных статистически значимы.

На втором этапе нами было проведено предварительное исследование эффективности коллагенового материала на модели ожоговой раны (белые крысы линии Wistar, контактный ожог горячей жидкостью на площади 2% поверхности тела). Получены положительные результаты, указывающие на сокращение сроков заживления ожоговых ран в эксперименте. Дальнейшее расширение областей применения нашего материала направлено на его адаптацию для работы с культурой фибробластов. Был разработан метод щадящей стерилизации ультрафиолетовым излучением, обеспечивающий 100% стерильность, модифицирован состав и технология изготовления для повышения прочностных характеристик. Полученные коллагеновые материалы использовались в качестве подложки культуры клеток. Проведены эксперименты *in vitro* по оценке жизнеспособности фибробластов в условиях культивирования с коллагеновым материалом, которые показали, что через 24 часа на поверхности коллагеновой гелевой плёнки-подложки отмечается наличие единичных клеток, а через 48 часов на поверхности исследуемого материала выявлено образование монослоя фибробластов.

Таким образом, полученные к настоящему результаты подтверждают эффективность разработанных биологически активных материалов на основе коллагена для лечения ран кожи и доказывают перспективность применения их усовершенствованных модификаций для замещения различных тканевых дефектов.

## **Трансплантация ткани аlogenного костного мозга как способ коррекции первичного мужского гипогонадизма**

Куликова П.А.<sup>1</sup>, Машков А.Е.<sup>2</sup>, Куликов А.В.<sup>3</sup>, Филюшкин Ю.Н.<sup>2</sup>, Куликов Д.А.<sup>2</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
2. ГБУЗ МО Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва, Россия
3. ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия [polinikul@mail.ru]

Мужской гипогонадизм – патология, характеризующаяся уменьшением уровня андрогенов в организме или снижением чувствительности к ним. По некоторым данным до 20% взрослых мужчин страдают приобретенным гипогонадизмом, отмечается тенденция к росту заболеваемости. Эта патология обуславливает разнообразные нарушения, как в социальной сфере, так и в соматическом здоровье мужчин. Снижение андрогенов может приводить к бесплодию. 17,5 % супружеских пар в России не могут иметь детей, причем в 30-40% это связано именно с мужским фактором. На сегодняшний день основной метод лечения гипогонадизма - терапия андрогенами, которая имеет ряд противопоказаний и осложнений, еще больше угнетает собственный андроген-синтезирующий аппарат. Гипогонадизм – социально значимая патология, требующая разработки новых подходов в лечении. Исследование возможностей коррекции гипогонадизма осложняется несовершенством всех известных из литературы экспериментальных моделей мужского гипогонадизма (токсичность, быстрое самовосстановление функции и др. недостатки описанных моделей).

Поэтому перед нами встали две последовательные задачи, во-первых, создание доступной модели мужского гипогонадизма со стойким нарушением гормонообразующей функции, во-вторых, разработка трансплантологического метода коррекции этой патологии. Целью нашего исследования является изучение возможности восстановления андроген-продуцирующей и репродуктивной функций и способов инициации этих процессов восстановления.

Работа проводилась на крысах Вистар массой 200-220 гр. Созданная нами модель гипогонадизма основана на временной ишемии тестикул, приводящей к стойкому нарушению гормонообразующей и репродуктивной функции.

Для коррекции патологии нами был разработан метод трансплантации аллогенной ткани костного мозга в пораженную область, что приводило к стойкому восстановлению как гормонообразующей, так и репродуктивной функций.

В сообщении будут подробно освещены материалы по созданию новой модели гипогонадизма и трансплантологическому способу его коррекции.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» 2013 г.

# Экспрессия транскрипционного фактора NeuroD1 в эпителии языка плодов человека

Куртова А.И.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАН, Москва, Россия

**Введение.** Neurogenic differentiation factor 1 (NeuroD1, Beta2/NeuroD, NDF1), фактор транскрипции класса bHLH, принимает участие в регуляции терминальных стадий дифференцировки клеток в центральной нервной системе, а также рецепторных клеток сетчатки и обонятельного эпителия. Помимо регуляции развития сенсорных систем, NeuroD1 участвует в процессах детерминации нейроэндокринных клеток и активирует транскрипцию их гормонов. Тем не менее, роль NeuroD1 в дифференцировке клеток вкусовых лукович языка человека остается неизученной. Цель данной работы – изучение распределения клеток, содержащих транскрипционный фактор NeuroD1, в эпителии языка плодов человека разных сроков развития.

**Материал и методика.** Работа выполнена на аутопсийном материале 35 плодов человека с 4-й по 21-ю неделю внутриутробного развития. При иммуногистохимической обработке использовали набор UltraVision LP Detection System HRP Polymer (LabVision, Великобритания). В качестве первых антител использовали мышиные моноклональные антитела к NeuroD1 (Abcam, США), рабочие разведения 1:400-1:800.

**Результаты и обсуждение.** Иммунопозитивная реакция на NeuroD1 была обнаружена в эпителии языка всех исследованных плодов с 8-й по 21-ю неделю развития. Иммунореактивность к этому маркеру была локализована в ядрах клеток.

На ранних стадиях внутриутробного развития (с 4-й по 7-ю неделю) иммунопозитивная реакция на NeuroD1 в эпителии языка эмбрионов человека отсутствовала, что может быть следствием отсутствия или низкого уровня экспрессии данного транскрипционного фактора.

На 8-й неделе развития в эпителии языка выявлена интенсивная и контрастная реакция на NeuroD1. Иммунопозитивные клетки локализованы как в базальном, так и в апикальных слоях эпителия. Клетки примордиев вкусовых лукович, появляющихся на данной стадии развития, также иммунопозитивны к NeuroD1.

К 10-й неделе развития распределение иммунореактивных ядер в эпителии языка становится более разреженным, их большая часть расположена в базальном слое. По-видимому, по мере дифференцировки эпителия уровень экспрессии NeuroD1 в верхних слоях эпителия языка снижается, оставаясь высоким в недифференцированных клетках базального слоя. Ядра некоторых клеток вкусовых лукович также иммунопозитивны на NeuroD1. Иммунореактивные ядра удлинённых клеток вкусовых лукович были окрашены заметно сильнее, чем ядра базальных клеток. Как и в неспециализированном эпителии, во вкусовых луковичах плодов человека наибольший уровень экспрессии NeuroD1 характерен для клеток, находящихся на терминальных стадиях дифференцировки.

С 14-й по 21-ю неделю внутриутробного развития наибольшее количество иммунопозитивных к NeuroD1 клеток локализовано в местах инвагинации эпителия языка, связанных с ростом сосочков и образованием протоков желез. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе внутриутробного развития человека NeuroD1 не только определяет дифференцировку клеток вкусовых лукович, но и играет важную роль в развитии других эпителиальных производных языка, которая требует дальнейшего изучения.

## **Влияние модифицирования GDNF на его активность, как индуктора нейральной дифференцировки прогениторных клеток**

Куст Н.Н.<sup>1,2</sup>, Пантелеев Д.Ю.<sup>1,3</sup>, Рыбалкина Е.Ю.<sup>2</sup>, Савченко Е.А.<sup>1,2,3</sup>, Ревещин А.В.<sup>1,3</sup>, Павлова Г.В.<sup>1,2,3</sup>

1. ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия
2. ООО «Апта-фарм»
3. ООО «ИМТК»

GDNF является одним из главных факторов выживания для дофаминэргических нейронов среднего мозга. GDNF обеспечивает рост аксонов и гипертрофию нейронов этого типа. На различных моделях болезни Паркинсона было показано, что GDNF может предотвращать нейротоксически спровоцированную гибель дофаминэргических нейронов и способствует восстановлению их функциональной активности. Однако обнаруживаются и побочные эффекты от использования GDNF, такие как потеря веса и возможность опухолевых новообразований. Полученная нами генетическая конструкция, содержащая ген GDNF человека была введена в клетки HEK293, а затем трансплантирована в паренхиму мозга мыши. Было обнаружено, что трансгенные клетки, экспрессирующие GDNF, значительно снижают образование глиального рубца. Таким образом, GDNF можно использовать при трансплантации в мозг для улучшения приживляемости трансплантата. Однако, у человека ген GDNF кодирует два варианта GDNF мРНК, pre-( $\alpha$ )pro-GDNF и укороченный pre-( $\beta$ )pro-GDNF. Причем было обнаружено, что pre-( $\alpha$ )pro-GDNF, секретируется через аппарат Гольджи, а pre-( $\beta$ )pro-GDNF, локализуется в основном в секреторных везикулах и движется по более быстрому секреторному пути. Возможно, pre-( $\alpha$ )pro-GDNF необходим для выживания нейронов в норме, тогда как pre-( $\beta$ )pro-GDNF необходим как SOS система при травматической гибели нейронов или при нейродегенеративных заболеваниях. Для исследования значимости pro области для быстрого транспорта и изменения индуктивных свойств фактора были сделаны несколько вариантов модифицированных GDNF. Секреция факторов в среду была доказана Вестерн-блот анализом. Данные модифицированные GDNF были трансплантированы в клетки HEK293 и получены трансгенные линии клеток. Среда, кондиционированная культивированием клеток с модифицированными GDNF была добавлена в среду культивируемого эмбрионального спинального ганглия крысы и проанализировано образование нейральных отростков. Было обнаружено, что удаление pro области значительно повышает эффект GDNF, как нейрального индуктора. Аналогичный результат был получен при исследовании культуры разрушенного спинального ганглия и подсчете количества нейральных отростков от клеток.

## **Получение и характеристика клеточной модели болезни Паркинсона на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток**

Лебедева О.С., Некрасов Е.Д., Богомазова А.Н., Честков И.В., Новосадова Е.В., Васина Е.М., Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Киселев С.Л., Лагарькова М.А., Хаспеков Л.Г., Иллариошкин С.Н., Гривенников И.А.

*ФГБУН Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия*

*ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия*

*ФГБУ Научный центр неврологии РАМН, Москва, Россия*

Нейродегенеративные заболевания широко распространены в человеческой популяции. Болезнь Паркинсона — это хроническое прогрессирующее дегенеративное заболевание центральной нервной системы, клинически проявляющееся нарушением произвольных движений. Для заболевания характерен летальный исход. В России 1 из 500 человек в общей популяции и 1 из 50 человек в популяции старше 80 лет страдает болезнью Паркинсона. Медикаментозные методы лечения наследственных нейродегенеративных заболеваний приносят лишь временное облегчение, замедляют развитие болезни, но никак не влияют на её причину. На данный момент наиболее перспективным методом лечения таких недугов представляется клеточная терапия, т.к. она позволяет заменить погибшие и нефункциональные клетки мозга. Отсутствует, также, и адекватный модельный объект для изучения течения заболевания и скрининга новых лекарственных препаратов. Новые нейроны для пациентов можно получить из их собственных клеток с использованием технологии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК). Такие клеточные культуры могут стать хорошим модельным объектом, поскольку несут в своем геноме мутации, ответственные за развитие болезни. ИПСК человека можно получить практически из любой ткани. Для них характерен неограниченный пролиферативный потенциал и плюрипотентность (способность дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма). В настоящее время разработаны способы направленной дифференцировки плюрипотентных клеток в различные специфические типы клеток, в том числе и в нейроны. Таким образом, получение культуры, обогащенной зрелыми нейронами до 70-90% вполне возможно. В нашей лаборатории получение индуцированных плюрипотентных клеток человека из кожи пациентов с болезнью Паркинсона осуществляется с помощью лентивирусной трансфекции кожных фибробластов векторами, несущими гены из «коктейля Яманака» Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc. Такой подход позволяет получать клоны, морфологически похожие на эмбриональные стволовые клетки, уже через две недели после инфекции. Далее была проведена характеристика полученных клонов на экспрессию основных маркеров плюрипотентного состояния Oct4, Sox2, Hesx1, Sall1, TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA4 (метод ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией и иммуноцитохимия). В качестве функционального теста на плюрипотентность использовали дифференцировку в производные всех трех зародышевых листков *in vitro* с последующим иммуноцитохимическим окрашиванием на соответствующие маркеры. Разработан эффективный протокол дифференцировки полученных мутантных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека в нейрональном направлении для получения культуры, обогащенной дофаминергическими нейронами, позволяющий через 1,5 месяца получать культуру на 80% состоящую из  $\beta$ -III-тубулин – положительных клеток, 20-40% из которых являются тирозингидроксилаза - положительными. С помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии были показаны различия в выбросе дофамина между популяциями нейронов, дифференцированных из ИПСК здорового донора и ИПСК пациента с болезнью Паркинсона.

# Исследование влияния мезенхимных стволовых клеток на формирование метастазов опухоли с использованием люминесцентного биоимиджинга

Мелешина А.В.<sup>1</sup>, Черкасова Е.И.<sup>1</sup>, Ширманова М.В.<sup>2</sup>, Клементьева Н.В.<sup>3</sup>, Киселева Е.В.<sup>3</sup>, Загайнова Е.В.<sup>1,2</sup>

1. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
2. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия
3. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

В последнее время повышенное внимание привлекает участие мезенхимных стволовых клеток (МСК) в патогенезе опухоли и их влияние на раковые клетки. При изучении различных экспериментальных моделей «опухоль – стволовая клетка» установлено, что с одной стороны МСК способны поддерживать опухолевый рост и способствовать образованию метастазов, с другой стороны – ингибировать рост опухолей. Для прижизненной визуализации формирования метастазов и миграции трансплантированных МСК в организме реципиента незаменимым инструментом является оптический имиджинг.

В данной работе изучено влияние МСК костного мозга человека (МСК КМ) на патогенез развития опухоли в ксеногенной модели.

Для получения стабильной линии МСК КМ, меченых геном люциферазы (МСК КМ-luc2), использовали технологию лентивирусной трансфекции. Модель метастазирования создавали путем внутривенной инъекции опухолевых клеток рака груди (MDA-ВМ-231), меченых красным флуоресцентным белком Turbo FP635, мышам линии Nude. МСК КМ-luc2 вводили внутривенно на 10 день после инъекции опухолевых клеток. Были сформированы следующие группы животных: 1) введение MDA-ВМ-231-Turbo FP635 и МСК КМ-luc2; 2) введение только MDA-ВМ-231-Turbo FP635. Для мониторинга формирования метастазов в легких и распределения МСК-luc2 в организме реципиента использовали методы флуоресцентного и биолюминесцентного имиджинга *in vivo* (IVIS Spectrum).

С помощью метода биолюминесцентной визуализации *in vitro* установлено, что после добавления к МСК КМ-luc2 субстрата D-люциферина на изображениях регистрируется биолюминесценция и культура сохраняет биолюминесцентные свойства в течение длительного периода времени. Люминесцентный биоимиджинг *in vivo* продемонстрировал, что на сроке от 2-х до 4-х недель после введения МСК КМ-luc2 люминесцентный сигнал в области легких увеличивался у всех животных 1-й группы. Однако к 7-й неделе уровень биолюминесценции сохранялся лишь у половины животных. Оценка люминесценции изолированных органов 1-й группы животных *ex vivo* показала наличие сигнала не только в легких, но и в печени, почках. Методом флуоресцентного имиджинга *in vivo* повышение уровня красной флуоресценции в области легких в 1й группе животных было обнаружено на 8-й неделе после введения опухолевых клеток. В то же время во 2й группе животных красный флуоресцентный сигнал MDA-ВМ-231-Turbo FP635 был детектирован уже на 6-й неделе и увеличивался вплоть до 8-й недели. Анализ флуоресценции органов животных *ex vivo* на 8-й неделе эксперимента подтвердил значительное увеличение уровня флуоресценции в легких животных 2й группы (2,00x10<sup>10</sup> фотон/с) по сравнению с таковым у животных 1й группы (9,23x10<sup>8</sup> фотон/с).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что МСК КМ в данной ксеногенной модели рака груди оказывают негативное влияние на формирование и число метастазов в легких *in vivo*, что возможно за счет непрямого ингибирующего действия МСК на опухолевые клетки.



# Исследование влияния мезенхимных стволовых клеток на формирование метастазов опухоли с использованием люминесцентного биоимиджинга

Мелешина А.В.<sup>1</sup>, Черкасова Е.И.<sup>1</sup>, Ширманова М.В.<sup>2</sup>, Клементьева Н.В.<sup>3</sup>, Киселева Е.В.<sup>3</sup>, Загайнова Е.В.<sup>1,2</sup>

1. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия
2. Нижегородская государственная медицинская академия, Нижний Новгород, Россия
3. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

В последнее время повышенное внимание привлекает участие мезенхимных стволовых клеток (МСК) в патогенезе опухоли и их влияние на раковые клетки. При изучении различных экспериментальных моделей «опухоль – стволовая клетка» установлено, что с одной стороны МСК способны поддерживать опухолевый рост и способствовать образованию метастазов, с другой стороны – ингибировать рост опухолей. Для прижизненной визуализации формирования метастазов и миграции трансплантированных МСК в организме реципиента незаменимым инструментом является оптический имиджинг.

В данной работе изучено влияние МСК костного мозга человека (МСК КМ) на патогенез развития опухоли в ксеногенной модели.

Для получения стабильной линии МСК КМ, меченых геном люциферазы (МСК КМ-luc2), использовали технологию лентивирусной трансфекции. Модель метастазирования создавали путем внутривенной инъекции опухолевых клеток рака груди (MDA-ВМ-231), меченых красным флуоресцентным белком Turbo FP635, мышам линии Nude. МСК КМ-luc2 вводили внутривенно на 10 день после инъекции опухолевых клеток. Были сформированы следующие группы животных: 1) введение MDA-ВМ-231-Turbo FP635 и МСК КМ-luc2; 2) введение только MDA-ВМ-231-Turbo FP635. Для мониторинга формирования метастазов в легких и распределения МСК-luc2 в организме реципиента использовали методы флуоресцентного и биолюминесцентного имиджинга *in vivo* (IVIS Spectrum).

С помощью метода биолюминесцентной визуализации *in vitro* установлено, что после добавления к МСК КМ-luc2 субстрата D-люциферина на изображениях регистрируется биолюминесценция и культура сохраняет биолюминесцентные свойства в течение длительного периода времени. Люминесцентный биоимиджинг *in vivo* продемонстрировал, что на сроке от 2-х до 4-х недель после введения МСК КМ-luc2 люминесцентный сигнал в области легких увеличивался у всех животных 1-й группы. Однако к 7-й неделе уровень биолюминесценции сохранялся лишь у половины животных. Оценка люминесценции изолированных органов 1-й группы животных *ex vivo* показала наличие сигнала не только в легких, но и в печени, почках. Методом флуоресцентного имиджинга *in vivo* повышение уровня красной флуоресценции в области легких в 1й группе животных было обнаружено на 8-й неделе после введения опухолевых клеток. В то же время во 2й группе животных красный флуоресцентный сигнал MDA-ВМ-231-Turbo FP635 был детектирован уже на 6-й неделе и увеличивался вплоть до 8-й недели. Анализ флуоресценции органов животных *ex vivo* на 8-й неделе эксперимента подтвердил значительное увеличение уровня флуоресценции в легких животных 2й группы (2,00x10<sup>10</sup> фотон/с) по сравнению с таковым у животных 1й группы (9,23x10<sup>8</sup> фотон/с).

Полученные данные позволяют сделать вывод, что МСК КМ в данной ксеногенной модели рака груди оказывают негативное влияние на формирование и число метастазов в легких *in vivo*, что возможно за счет непрямого ингибирующего действия МСК на опухолевые клетки.

# Модификация миелоидных клеток аденозином для повышения их регенеративного потенциала при аутологической трансплантации

Невская К.В.<sup>1</sup>, Юрьева К.С.<sup>2</sup>, Иванюк Е.Э.<sup>1</sup>, Дзюман А.Н.<sup>1</sup>, Иванов В.В.<sup>1</sup>, Сазонов А.Э.<sup>1</sup>

1. ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия
2. «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

**Введение.** Доказано, что регенеративная терапия стволовыми клетками является эффективной в лечении целого спектра заболеваний (Andrade, 2006; Baraniak, 2010; Abdel-Latif, 2007; Orlic, 2001; Lindvall, 2006; Kim, 2009; Sykes, 2005). В литературе появляется все больше доказательств в пользу гипотезы о том, что механизм действия стволовых клеток обусловлен секрецией целого спектра цитокинов (Kinnard T. et al., 2004, Lindolfo et al., 2009, Tendera M. et al, 2005; Burchfield et al, 2008) Можно предположить, что увеличение уровня секретируемых стволовыми клетками цитокинов приведет к еще более выраженному регенеративному эффекту. Известно, что аденозин (эндогенный пуриновый нуклеозид, промежуточный продукт метаболизма адениновых нуклеотидов, обладающий свойствами сигнальной молекулы) способен влиять на выработку паракринных факторов различными типами клеток (Feoktistov et al., 1995; Reece, 2003; Zhong H et al. 2004)

**Цель:** изучить влияние модифицированных аденозином миелоидных клеток на заживление ожоговой раны у мышей.

**Материал и методы.** В исследование были включены 32 мыши линии C57Bl/6JY массой 25-28 г. У 5 мышей из бедренных и большеберцовых костей был выделен костный мозг. Для стимуляции аденозиновых рецепторов использовали негидролизующий аналог аденозина NECA в концентрации 100 мкМ (в качестве контроля в лунки добавляли 100 мкМ растворителя NECA – DMSO). Инкубировали в течение 3 суток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем отмывали от ростовой среды и ресуспендировали в физиологическом растворе для инъекций. 27 мышам наносили ожог IIIБ-IV степени диаметром 1 см в области спины. Мыши были разделены на 3 подгруппы, по 9 животных в каждой: 1й подгруппе в область ожога вводили физиологический раствор, 2й – клетки, культивированные с добавлением DMSO, 3й – клетки, стимулированные NECA. На 5, 7 и 14 сутки животные были выведены из эксперимента, производился забор материала для гистологического исследования.

**Результаты.** На 5-7-е сутки во всех группах в исходе коагуляционного некроза наблюдали формирование так называемого струпа, представляющего некротизированный участок кожи. На границе струпа и дна ожога всегда формировалась зона демаркационного воспаления, характеризующаяся сосудистыми (полнокровие и отек) и клеточными (гранулоцитарный инфильтрат) реакциями. Затем шло постепенное параллельное восстановление соединительнотканного каркаса кожи и эпителизация. При введении мышам аутологических клеток костного мозга наблюдали раннее развитие грануляционной ткани в сохранившемся неповрежденном сетчатом слое дермы, завершившееся формированием зрелых коллагеновых волокон и восстановлением обычной архитектуры дермы. Так, например, на 14 сутки в группе введения модифицированных клеток объемная плотность коллагеновых волокон оказалась на 63% выше по сравнению с контрольной группой и 57% - по сравнению с клетками без модификации, плотность дермы на 26% и 31% соответственно. Интенсивность отека в группе введения модифицированных клеток была в 4 раза меньше по сравнению с контрольной группой и в 2 раза – по сравнению с клетками без модификации ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, введение экспериментальным животным модифицированных аутологичных клеток приводило к ускорению развития и созревания соединительной ткани, что свидетельствует об увеличении скорости регенерации ожоговой раны.

# Модификация миелоидных клеток аденозином для повышения их регенеративного потенциала при аутологической трансплантации

Невская К.В.<sup>1</sup>, Юрьева К.С.<sup>2</sup>, Иванюк Е.Э.<sup>1</sup>, Дзюман А.Н.<sup>1</sup>, Иванов В.В.<sup>1</sup>, Сазонов А.Э.<sup>1</sup>

1. ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия
2. «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

**Введение.** Доказано, что регенеративная терапия стволовыми клетками является эффективной в лечении целого спектра заболеваний (Andrade, 2006; Baraniak, 2010; Abdel-Latif, 2007; Orlic, 2001; Lindvall, 2006; Kim, 2009; Sykes, 2005). В литературе появляется все больше доказательств в пользу гипотезы о том, что механизм действия стволовых клеток обусловлен секрецией целого спектра цитокинов (Kinnard T. et al., 2004, Lindolfo et al., 2009, Tendera M. et al, 2005; Burchfield et al, 2008) Можно предположить, что увеличение уровня секретируемых стволовыми клетками цитокинов приведет к еще более выраженному регенеративному эффекту. Известно, что аденозин (эндогенный пуриновый нуклеозид, промежуточный продукт метаболизма адениновых нуклеотидов, обладающий свойствами сигнальной молекулы) способен влиять на выработку паракринных факторов различными типами клеток (Feoktistov et al., 1995; Reece, 2003; Zhong H et al. 2004)

**Цель:** изучить влияние модифицированных аденозином миелоидных клеток на заживление ожоговой раны у мышей.

**Материал и методы.** В исследование были включены 32 мыши линии C57Bl/6JY массой 25-28 г. У 5 мышей из бедренных и большеберцовых костей был выделен костный мозг. Для стимуляции аденозиновых рецепторов использовали негидролизуемый аналог аденозина NECA в концентрации 100 мкМ (в качестве контроля в лунки добавляли 100 мкМ растворителя NECA – DMSO). Инкубировали в течение 3 суток при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Затем отмывали от ростовой среды и ресуспендировали в физиологическом растворе для инъекций. 27 мышам наносили ожог IIIБ-IV степени диаметром 1 см в области спины. Мыши были разделены на 3 подгруппы, по 9 животных в каждой: 1й подгруппе в область ожога вводили физиологический раствор, 2й – клетки, культивированные с добавлением DMSO, 3й – клетки, стимулированные NECA. На 5, 7 и 14 сутки животные были выведены из эксперимента, производился забор материала для гистологического исследования.

**Результаты.** На 5-7-е сутки во всех группах в исходе коагуляционного некроза наблюдали формирование так называемого струпа, представляющего некротизированный участок кожи. На границе струпа и дна ожога всегда формировалась зона демаркационного воспаления, характеризующаяся сосудистыми (полнокровие и отек) и клеточными (гранулоцитарный инфильтрат) реакциями. Затем шло постепенное параллельное восстановление соединительнотканного каркаса кожи и эпителизация. При введении мышам аутологических клеток костного мозга наблюдали раннее развитие грануляционной ткани в сохранившемся неповрежденном сетчатом слое дермы, завершившееся формированием зрелых коллагеновых волокон и восстановлением обычной архитектуры дермы. Так, например, на 14 сутки в группе введения модифицированных клеток объемная плотность коллагеновых волокон оказалась на 63% выше по сравнению с контрольной группой и 57% - по сравнению с клетками без модификации, плотность дермы на 26% и 31% соответственно. Интенсивность отека в группе введения модифицированных клеток была в 4 раза меньше по сравнению с контрольной группой и в 2 раза – по сравнению с клетками без модификации ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, введение экспериментальным животным модифицированных аутологичных клеток приводило к ускорению развития и созревания соединительной ткани, что свидетельствует об увеличении скорости регенерации ожоговой раны.

## Применение систем TALEN и CRISPR/CAS9 для исправления генетических мутаций в плюрипотентных клетках крыс Brattleboro

Немудрый А.А.<sup>1,2,3\*</sup>, Стеклова А.Е.<sup>1,2,3</sup>, Медведев С.П.<sup>1,2,3</sup>, Васькова Е.А.<sup>1,2,3</sup>, Иванова Л.Н.<sup>1</sup>, Покушалов Е.А.<sup>2</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3</sup>

1. ФГБУ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
2. ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени ак. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
3. ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия \* [nemudryy@bionet.nsc.ru]

Благодаря развитию геномной инженерии в последние годы появились доступные и легко воспроизводимые методики редактирования генома. К таким методиками относятся технологии TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) открытые у бактерий. Данные системы позволяют специфично вносить двуниевые разрывы в выбранные сайты в последовательности ДНК *in vitro*. Такие разрывы увеличивают частоту гомологичной рекомбинации, при которой происходит обмен участками ДНК между гомологичными районами. Актуальным направлением является совместное применение описанных выше передовых методов геномной инженерии и клеточных технологий для исследований в области регенеративной медицины. В 2006 году впервые показана возможность получения плюрипотентных стволовых клеток из дифференцированных тканей. Полученные таким образом индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) могут быть использованы в качестве материала для клеточной терапии различных патологий. Более того, в ИПСК пациента с помощью гомологичной рекомбинации возможно исправить мутации, которые вызывают наследственные заболевания. Такие клетки с «исправленным» геномом являются аутологичными по отношению к организму пациента и могут быть использованы для терапии наследственного заболевания.

В данной работе была создана модель для проведения исследований и разработки технологии исправления генетических мутаций, вызывающих наследственные заболевания. Объектом работы являются крысы лабораторной линии Brattleboro, которые являются носителем моногенного наследственного заболевания. Мутация *di/di* (diabetes insipidus) в гене гормона аргинин-вазопрессина вызывает развитие несахарного гипоталамического диабета, для которого характерно повышенное потребление и выделение воды.

На настоящий момент получены и полностью охарактеризованы с помощью молекулярно-генетических и цитологических методик 8 линий ИПСК крыс Brattleboro и 2 линии ИПСК контрольных крыс WAG, проведен транскриптомный и протеомный анализ полученных линий. Для увеличения эффективности гомологичной рекомбинации, с помощью которой будет исправлен мутантный генотип *di/di*, созданы конструкции, экспрессирующие искусственные нуклеазы TALENs и CRISPR/Cas9. В результате биоинформатического анализа выбраны сайты для внесения двуниевых разрывов в последовательность ДНК локуса гена аргинин-вазопрессина. Для каждого из сайтов получены конструкции, экспрессирующие нуклеазы TALENs и CRISPR/Cas9. С помощью секвенирования по Сэнгеру установлены последовательности полученных генетических конструкций и отобраны клоны. Исследована способность, полученных искусственных нуклеаз, вносить двуниевые разрывы в выбранные сайты.

В результате получена система, состоящая из модельной линии крыс Brattleboro (и контрольной линии крыс WAG), индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) и генетических конструкций, кодирующих нуклеазы TALENs и CRISPR/Cas9, которые на несколько порядков увеличивают эффективность исправления мутаций *in vitro* с помощью гомологичной рекомбинации. Такая система позволит проводить исследования по разработке технологии коррекции наследственных заболеваний с помощью клеточных технологий. Результаты таких исследований могут быть применены для лечения наследственных заболеваний человека.

# **Новый метод органотипического культивирования *in vitro* тканей глаза крысы для изучения состояния тканей при патологиях *in vivo***

Новикова Ю.П., Григорян Э.Н.

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

Нами предложен метод для органотипического роллерного 3D культивирования заднего сектора (комплекс «пигментный эпителий + сосудистая оболочка + склеральная оболочка») и сетчатки глаза взрослой крысы альбиноса. Метод позволяет поддерживать жизнеспособную ткань *in vitro* в течение как минимум 14 дней, т.е. во много раз дольше, чем при использовании условий стационарного культивирования *in vitro*. Метод дает возможность наблюдения за поведением клеток пигментного эпителия сетчатки во взаимодействии с хориокапиллярной оболочкой, что не может быть сделано при использовании его клеточной культуры. Основная новизна метода состоит в том, что органотипическое культивирование происходит в замкнутом объеме, без смены среды и при постоянном вращении. При этом образцы ЗСГ и сетчатки не взаимодействуют с внутренней поверхностью флаконов, что при постоянном перемешивании среды в результате вращения обеспечивало омывание препаратов свежей порцией среды и не допускало их деформации. С помощью предложенного метода проведено исследование пигментного эпителия глаза в составе комплекса и изолированной сетчатки и показано, что их клетки в условиях роллерного органотипического культивирования способны к трансформации фенотипа, миграции и пролиферации. В отсутствие взаимодействия с сетчаткой клетки пигментного эпителия активно проявляют свойства фагоцитов как вне слоя, так и оставаясь в его составе. События, происходящие с клетками пигментного эпителия в условиях роллерного культивирования *in vitro*, аналогичны тем, что наблюдаются при различных патологиях сетчатки *in vivo*. Данный подход может быть использован для а) исследования действия на пигментный эпителий и сетчатку глаза различных факторов при добавлении их в среду культивирования, б) моделирования процессов, происходящих в пигментном эпителии при повреждении и патологических состояниях сетчатки, и в) изучения регенерационных ответов клеток пигментного эпителия сетчатки у развивающихся и взрослых высших позвоночных животных. Работа поддержана грантом РФФИ (№11-04-00125-а).

## Маркирование процесса нейрогенеза с помощью адресной модификации генома

К.Е.Орищенко<sup>1</sup>, А.Г. Мензоров<sup>1</sup>, В.С.Фишман<sup>1</sup>, М. Pasqualetti<sup>2</sup>, М. Bader<sup>3</sup>, N. Alenina<sup>3</sup>, Н.Б.Рубцов<sup>1</sup>  
О.Л.Серов<sup>1</sup>

1. ФГБУ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия

2. University of Pisa, Pisa, Italy

3. Max-Delbruck-Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

Разработка технологии получения эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных стволовых (ИПС) клеток открыло перспективу направленной их дифференцировки в различные типы соматических клеток. Перспективным представляется получение специализированных нейронов с конечной целью их трансплантации пациентам с нейродегенеративными заболеваниями. При дифференцировке ЭСК и ИПС клеток *in vitro* регистрируются нейральные клетки-предшественники способные к дальнейшей дифференцировке в нейрональные и глиальные клетки. Имеются примеры успешного получения дофаминергических, холинергических, норадренергических нейронов. Одной из проблем является идентификация и «отбор» специализированных нейронов. Примером такого рода могут служить эксперименты по идентификации серотонинергических нейронов при дифференцировке *in vitro* ИПС клеток мыши. Клоны ИПС клеток получали из эмбриональных фибробластов мышей, у которых ген Trh2 (tryptophan hydrolase 2) был замещен геном GFP (green fluorescent protein). Фибробласты были трансфицированы полицистронным лентивирусным вектором, несущим гены Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 под контролем DOX (doxycycline) индуцибельным промотором и на 10-15 дни были собраны первичные колонии ИПС клеток. Нейральная дифференцировка была индуцирована через образование эмбрионных телец. Первые GFP-позитивные клетки с нейральной морфологией были идентифицированы на 14-й день после индукции дифференцировки. В течение последующих 7 дней число GFP-позитивных серотонин-содержащих клеток увеличивалось. Таким образом, предлагаемая система идентификации серотонинергических нейронов может быть полезной при дифференцировке ИПС клеток или трансдифференцировке фибробласт-нейрон. Сходный подход был реализован по адресному «слиянию» репортерного гена GFP с геном Tuj1 (бета-тубулин III), используя TALEN-технологии в геном ЭСК клеток мыши. Инсерция последовательности гена GFP была проведена в двух версиях – перед и после стоп кодона гена Tuj1. Транскрипция генов Tuj1 и GFP реализуется единым транскриптом, но при трансляции первичного транскрипта белки - бета-тубулин III и «зеленый белок» - разделяются. Дифференцировка ЭСК с адресной вставкой гена GFP позволяет визуализировать нейральные клетки по флуоресцентному свечению. Известно, что бета-тубулин III является нейрон-специфическим маркером и одновременно одним самых ранних маркеров коммитирования нейро-эпителиальных клеток к дифференцировке в нейроны. Таким образом, появляется реальная возможность отбора клеток-предшественников для исследования их свойств как *in vitro*, так *in vivo*.

# Молекулярно-генетические аспекты дифференцировки и деления стволовых клеток у рептилий при регенерации

Павлова Г.В., Пантелеев Д.Ю.

ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия

Регенеративная способность присуща многим животным. Высокой степенью регенерации обладают низшие животные, чего нельзя сказать о человеке. Филогенетический анализ показывает, что в высшей степени способностью восстанавливать утраченные конечности и другие части тела присущи хвостатым амфибиям (саламандры, тритоны), некоторым низшим бесхвостым амфибиям, в меньшей степени – рыбам. С переходом к гомойотермности, регенераторные способности практически полностью исчезают. У млекопитающих (мышей) регенерация сохраняется в ограниченном объеме только в новорожденном возрасте. У человека восстанавливаются лишь определенные ткани органов (такие как печень, кости, эпителий и др.). Однако, в целом регенерация тканей и органов у *Homo sapiens* очень невелика и далека от совершенства. Высокая восстановительная способность хладнокровных животных давно привлекало внимание исследователей. Современные исследования показали, что восстановительный процесс у пойкилотермных животных связан с иннервацией регенерирующих областей. Недавние исследования показывают, что в регуляции пролиферативной активности периферических стволовых (прогениторных) клеток, важную роль играют белки циркадных циклов или *timing* белки. Нами для исследования выбран объект, который обладает высокой степенью регенерации - геккон *Hemidactylus sp.*, (*Geckonidae*). С целью изучения пролиферативных способностей клеток нейрального происхождения у видов с высокими регенеративными способностями впервые получена пересеваемая культура нейральных клеток эмбриона геккона. Полученная культура проанализирована молекулярно-генетическими и иммуногистохимическими методами. Исследованы нейральные характеристики и пролиферативные свойства культуры в ответ на повышенную (хит-шоковую) и пониженную (колд-шоковую) температуры. Проведен поиск факторов, коррелирующих с пролиферацией клеток нейрального происхождения.

# Роль макрофагов в молекулярных механизмах межклеточных взаимодействий при клеточной регенерации

Панин Л.Е.

*ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, Новосибирск, Россия*

Показано, что резидентные макрофаги занимают ключевые позиции в механизмах внутриклеточной регенерации соматических клеток. Ключевым звеном межклеточных взаимодействий при регенерации служит комплекс аполипопротеин А-I -тетрагидрокортизол (апоА-I - ТГК), который выполняет роль транскрипционного фактора. Комплекс образуется в макрофагах при кооперативном захвате ими продуктов клеточной деградации, липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и кортизола. В результате лимитированного протеолиза ЛПВПЗ во вторичных лизосомах освобождается белок – апо А-I. Кортизол восстанавливается до тетрагидрокортизола (ТГК). Образуется комплекс апоА-I - ТГК, который ресекретируется в интерстиций и в дальнейшем захватывается соматическими клетками. В ядрах клеток он взаимодействует с депротеинизированными участками ДНК в области (GCC)<sub>n</sub> повторов. Известно, что указанные повторы входят в промоторы многих генов, в том числе и рибосомальных. При этом комплекс запускает их экспрессию. Значительное увеличение рибосом на шероховатом эндоплазматическом ретикулуме усиливает синтез белка в клетках на матрицах мРНК. При этом происходит восстановление внутриклеточных структур.

Аналогичный механизм действует и при клеточной пролиферации. Известно, что (GCC)<sub>n</sub> повторы входят в структуру многих регуляторных элементов ДНК. После депротеинизации ДНК в делящихся клетках эти повторы становятся доступными для апоА-I - ТГК комплекса. Взаимодействие комплекса с депротеинизированной ДНК инициирует её редупликацию и усиливает клеточное деление.

Методами атомно-силовой микроскопии и ферментативного анализа показано влияние метилирования GCNGC сайтов ДНК на ее связывание с комплексом апоА-I – ТГК. Обнаружено, что ДНК в регенерирующей печени крысы деметилирована по сайтам GCNGC. В этих условиях отмечается активное связывание комплекса апоА-I – ТГК, образование одноцепочечных нуклеазочувствительных участков в ДНК и усиление ее копирования. Митотическая активность гепатоцитов при этом в регенерирующей печени после ее частичной резекции возрастает.



# Анализ роли транскрипционного фактора Prep1 в процессах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши

Д. Пеньков<sup>1</sup>, А. Laurent<sup>3</sup>, А. Егоров<sup>2</sup>, F. Blasi<sup>3</sup>, В. Ткачук<sup>2</sup>

1. *ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава России, Москва, Россия*
2. *Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
3. *IFOM, Milan, Italy*

Нами исследовалась роль транскрипционного фактора Prep1 в эмбриональных стволовых клетках мыши (mES cells). Prep1 является гомеобокс-содержащим фактором, который принадлежит к семейству TALE-белков и выполняет важнейшие функции как на стадии развития эмбриона, так и во взрослом организме. Недавно было показано, что он также важен для дифференцировки и/или самообновления эмбриональных стволовых клеток. Для выяснения механизмов роли Prep1 в ES клетках нами были проведены ChIP-seq и RNA-seq исследования с использованием антитела к Prep (Prep1 и Prep2) и нокаутных (KO) эмбриональных стволовых клеток, полученных из Prep1-дефицитных мышей (Prep1 KO ES cells). Анализ связывания фактора Prep1 с ДНК на уровне генома показывает, что в половине случаев Prep1 связывается с генами в промоторной области, в 30% случаев – внутри области транскрипции, и только в 20% случаев – далеко (дальше 20 кб) от каких-либо генов. Корреляция с полученными ранее данными о модификациях хроматина позволила нам сделать выводы о сравнительно высокой доли связывания Prep1 с активными участками хроматина. Нами был также определен ДНК-мотив связывания Prep1 и произведен его всесторонний анализ in-vitro.

Использование KO эмбриональных стволовых клеток позволило нам изучить влияние Prep1 на экспрессию генов. Сравнение генов, увеличивающих и уменьшающих свою экспрессию, убедительно показывает, что Prep1 функционирует в большинстве случаев как активатор транскрипции. Классификация генов, уменьшающих свою экспрессию в наибольшей степени в Prep1 KO клетках, показывает, что Prep1 действительно играет основную роль в процессах, связанных с дифференцировкой клеток.

Анализ полученных данных также выявил центральную роль Prep1 в Wnt-beta-catenin и FGF сигнальных каскадах, так как больше половины Wnt генов снижают свою экспрессию в несколько раз при отсутствии Prep1. Сходная ситуация наблюдается с генами FGF и рецепторов FGF. Эти данные были подтверждены нами в модели in-vitro дифференцировки эмбриональных стволовых клеток, а также обобщены на примере клеточной линии преадипоцитов 3T3-L1 с помощью количественного ПЦР анализа и иммуноблотинга.

Таким образом, нами был проведен полногеномный анализ функции гена Prep1 в эмбриональных стволовых клетках и показана его важную роль в Wnt-beta-catenin и FGF сигнальных каскадах.

## **Гетерогенные биополимерные имплантаты в тканевой инженерии и регенеративной медицине**

---

Перова Н.В., Сургученко В.А., Пономарева А.С., Севастьянов В.И.

*ФГБУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздрава РФ, Москва, Россия [ viksev@yandex.ru ]*

---

В настоящее время для длительной компенсации функции поврежденного органа используются приемы тканевой инженерии, предполагающие создание имплантируемых тканеинженерных конструкций (ТИК). Ключевым вопросом создания эффективных ТИК является разработка матриц (каркасов), обеспечивающих локализацию клеток в месте имплантации и длительное их функционирование.

Целью проведенного цикла работ явилось доказательство эффективности применения разработанных инъекционных форм гетерогенных биополимерных гидрогелей (ГБГ) как самостоятельной имплантируемой системы для замещения дефектов тканей, в том числе, для стимулирования процессов регенерации собственных тканей пациента, так и в качестве временного каркаса для трансплантации клеток и создания тканеинженерных конструкций.

Композиции ГБГ получали из гидролизата эмбриональных или постнатальных коллагеносодержащих тканей животного происхождения с использованием технологии ультрадиспергирования гидрогелей с последующей радиационной сшивкой. Варьируя состав и размер микрочастиц из сшитого гидролизата или коллагена от 30 мкм до 300 мкм, а также соотношение гетерогенной и жидкой фаз, был создан линейный ряд ГБГ с разными реологическими свойствами и временем биорезорбции (от нескольких недель до нескольких месяцев).

Результаты экспериментальных исследований по созданию клеточно-инженерных конструкций хрящевой ткани свидетельствуют о способности ГБГ длительное время поддерживать жизнедеятельность клеток, включая процессы их пролиферации, дифференциации и синтеза собственного внеклеточного матрикса, который постепенно замещает резорбирующийся биоискусственный матрикс. Данные клинических исследований доказали эффективность применения ГБГ как биоактивной искусственной синовиальной жидкости при дегенеративно-дистрофических поражениях суставов.

# Влияние содержания кислорода на ММСК в условиях окислительного стресса, вызываемого перекисью водорода

Погодина М.В., Буравкова Л.Б.

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

Перспектива использования стволовых клеток во многом зависит от их устойчивости к повреждающим воздействиям. В данной работе проводилось исследование ответа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на окислительный стресс. Для проведения экспериментов использовали ММСК 2-5 пассажей, постоянно культивируемые в среде с содержанием кислорода 20% (ММСК-20), 5% (ММСК-5) и 1% (ММСК-1). Окислительный стресс моделировали действием перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в диапазоне концентраций 0,5-30 пМ/кл. Через 24 ч после начала воздействия определяли жизнеспособность ММСК методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора Annexin V-FITC/PI, активность каталазы в клетках по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония, а также оценивали продукцию ММСК IL-6 и IL-8 методом иммуноферментного анализа.

Доля живых клеток в культурах без воздействия пероксида водорода при 20%, 5% и 1% O<sub>2</sub> была одинаково высокой (91-93%). При обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оценка жизнеспособности ММСК по величине LD<sub>50</sub> не выявила существенных различий между клетками, культивировавшимися при 20% и 1% кислорода. Для ММСК-20 данная величина составила 11 - 13 пМ/кл., для ММСК-1 - 12-14 пМ/кл. При культивировании в 5% O<sub>2</sub> наблюдался некоторый сдвиг диапазона значений LD<sub>50</sub> (7-11,5 пМ/кл.). Уменьшение доли живых клеток при воздействии перекиси водорода происходило за счет увеличения количества клеток в состоянии апоптоза и постапоптотического некроза.

Активность каталазы в клетках при 5% O<sub>2</sub> была несколько ниже по сравнению с ММСК-20 и ММСК-1. Этим может объясняться полученное снижение величины LD<sub>50</sub> для данной группы клеток. При обработке клеток перекисью водорода в небольших концентрациях, соответствующих LD<sub>5</sub> и LD<sub>15</sub>, во всех группах клеток наблюдался рост активности каталазы. При этом наиболее активный ответ ММСК-20 обнаружен на LD<sub>5</sub>, а ММСК-5 и ММСК-1 - на LD<sub>15</sub>.

Анализ содержания IL-6 и IL-8 в среде культивирования показал, что ММСК при 20% кислорода секретируют большее количество провоспалительных интерлейкинов по сравнению с гипоксическими средами. Окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода в концентрации, соответствующей LD<sub>15</sub>, вызывает повышение продукции IL-6 и IL-8 во всех группах клеток в 1,5-2 раза. При воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в дозе LD<sub>5</sub> уровень продукции исследуемых интерлейкинов достоверно не изменялся.

Таким образом, содержание кислорода в среде культивирования не влияет на секрецию IL-6 и IL-8 в условиях окислительного стресса, однако может определять активность ферментов антиоксидантной защиты, в частности каталазы, которая опосредует более высокую устойчивость клеток к воздействию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при 20% и 1% O<sub>2</sub>.

Работа выполнена при поддержке программы ОФФМ РАН.

# Влияние содержания кислорода на ММСК в условиях окислительного стресса, вызываемого перекисью водорода

Погодина М.В., Буравкова Л.Б.

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

Перспектива использования стволовых клеток во многом зависит от их устойчивости к повреждающим воздействиям. В данной работе проводилось исследование ответа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на окислительный стресс. Для проведения экспериментов использовали ММСК 2-5 пассажей, постоянно культивируемые в среде с содержанием кислорода 20% (ММСК-20), 5% (ММСК-5) и 1% (ММСК-1). Окислительный стресс моделировали действием перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в диапазоне концентраций 0,5-30 пМ/кл. Через 24 ч после начала воздействия определяли жизнеспособность ММСК методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора Annexin V-FITC/PI, активность каталазы в клетках по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония, а также оценивали продукцию ММСК IL-6 и IL-8 методом иммуноферментного анализа.

Доля живых клеток в культурах без воздействия пероксида водорода при 20%, 5% и 1% O<sub>2</sub> была одинаково высокой (91-93%). При обработке H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оценка жизнеспособности ММСК по величине LD50 не выявила существенных различий между клетками, культивировавшимися при 20% и 1% кислорода. Для ММСК-20 данная величина составила 11 - 13 пМ/кл., для ММСК-1 - 12-14 пМ/кл. При культивировании в 5% O<sub>2</sub> наблюдался некоторый сдвиг диапазона значений LD50 (7-11,5 пМ/кл.). Уменьшение доли живых клеток при воздействии перекиси водорода происходило за счет увеличения количества клеток в состоянии апоптоза и постапоптотического некроза.

Активность каталазы в клетках при 5% O<sub>2</sub> была несколько ниже по сравнению с ММСК-20 и ММСК-1. Этим может объясняться полученное снижение величины LD50 для данной группы клеток. При обработке клеток перекисью водорода в небольших концентрациях, соответствующих LD5 и LD15, во всех группах клеток наблюдался рост активности каталазы. При этом наиболее активный ответ ММСК-20 обнаружен на LD5, а ММСК-5 и ММСК-1 - на LD15.

Анализ содержания IL-6 и IL-8 в среде культивирования показал, что ММСК при 20% кислорода секретируют большее количество провоспалительных интерлейкинов по сравнению с гипоксическими средами. Окислительный стресс, вызванный пероксидом водорода в концентрации, соответствующей LD15, вызывает повышение продукции IL-6 и IL-8 во всех группах клеток в 1,5-2 раза. При воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в дозе LD5 уровень продукции исследуемых интерлейкинов достоверно не изменялся.

Таким образом, содержание кислорода в среде культивирования не влияет на секрецию IL-6 и IL-8 в условиях окислительного стресса, однако может определять активность ферментов антиоксидантной защиты, в частности каталазы, которая опосредует более высокую устойчивость клеток к воздействию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при 20% и 1% O<sub>2</sub>.

Работа выполнена при поддержке программы ОФФМ РАН.

## Новые подходы к проблеме индукции хондрогенеза в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

А.В. Попова<sup>1</sup>, Е.А. Губарева<sup>1</sup>, Е.В. Куевда<sup>1</sup>, А.С. Сотниченко<sup>1</sup>, Р. Jungebluth<sup>2</sup>, М. Lim<sup>2</sup>,  
Y. Gustafsson<sup>2</sup>, P. Macchiariini<sup>2</sup>

1. ГБОУ ВПО КубГМУ Минздрава России, Международный научно-исследовательский клинично-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия
2. Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция

Среди патологии дыхательных путей существует огромное количество заболеваний, требующих оперативного хирургического вмешательства, зачастую включающего полную резекцию органа. Тканевая инженерия, подразумевающая различные методы модифицирования клеток или тканей с целью восстановления, регенерации или замещения ткани в организме, представляет собой многообещающую ветвь в данной области. Тканеинженерный метод с использованием биореактора для трахеи можно назвать значимой и успешной технологией при трансплантации трахеи. В концепции подхода выделяют четыре основополагающих элемента: (а) децеллюляризованная донорская трахея/ синтетический биоискусственный каркас (b) клетки, выделенные из костного мозга (с) специально спроектированный биореактор, в котором перед трансплантацией аутологичные клетки заселяются на определенные поверхности матрикса (d) фармацевтическое воздействие и биоактивные молекулы. Применение данной стратегии делает возможным получение жизнеспособных, функционирующих, фенотипически стабильных хондроцитов на каркасе. Воздействие специальной среды, содержащей хондрогенные факторы роста, на мезенхимальные стромальные стволовые клетки (ММСК) оказывает эффект на их способность к дифференцировке. Согласно ряду исследований, трансформирующий фактор роста бета (TGF- $\beta$ ), паратиреоидный гормон (PTHrP), инсулин и дексаметазон играют важную роль в процессе хондрогенеза *in vitro*, а культивирование ММСК в условиях 3D структуры является обязательным аспектом успешной дифференцировки в хондроциты. Использование данного подхода в тканеинженерной хирургии позволяет осуществлять полноценное замещение трахеи. Согласно некоторым исследованиям TGF- $\beta$  выполняет роль индуктора хондрогенеза *in vitro*. Длительное воздействие данного фактора роста на ММСК не обязательно, тогда как критическим периодом его применения считается первая неделя хондрогенеза. Другие исследования показали, что постоянное применение дексаметазона совместно с TGF- $\beta$  может иметь синергетический эффект с PTHrP в условиях стандартной хондрогенной среды. На основании вышеперечисленных утверждений мы можем предположить, что PTHrP мог бы не только предотвращать гипертрофию хондроцитов, но и выполнять в процессе дифференцировки роль, схожую с TGF- $\beta$ . Следовательно, PTHrP мог бы функционально заменить TGF- $\beta$  в специальной хондрогенной среде, что позволило бы избежать ряда экономических проблем при трансплантациях трахеи. Результаты прелиминарных исследований *in vitro*, проведенных нами, позволяют считать возможным удаление TGF- $\beta$  из хондрогенной среды, в которой присутствуют PTHrP, дексаметазон и инсулин. ММСК были помещены в специальную среду как в момент заселения клеток на планшет, так и спустя 24 часа. В обоих случаях PTHrP, вероятно, оказывал эффект на процесс дифференцировки без участия TGF- $\beta$ . Низкие концентрации PTHrP без участия TGF- $\beta$  демонстрировали позитивный эффект на дифференцировку в хондроциты, в то же время высокие концентрации того же вещества вызывали супрессию процесса.

## **Поступление ионов кальция из сателлитных клеток в мышечное волокно: новая функция сателлитных клеток**

Почаев В.А., Красный А.М., Озернюк Н.Д.

ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия  
[ozernyuk@mail.ru]

Изучение особенностей сателлитных (стволовых) клеток скелетных мышц в культуре - источник важной информации об их структуре и функциях, а также дифференцировке. В частности, изолированные сателлитные клетки способны дифференцироваться в многоядерные миотубы с последующим образованием сокращающихся мышечных волокон. Однако данные, полученные на клеточных культурах, как известно, связаны с существенными ограничениями при интерпретации получаемых *in vitro* результатов на нативную мышечную ткань. Поэтому для анализа особенностей биологии сателлитных клеток необходимы более адекватные методы, приближенные к условиям *in vivo*. Такой моделью могут служить изолированные мышечные волокна с сателлитными клетками, локализованными на их поверхности.

Ранее нами на модели *in situ* (сателлитные клетки на изолированном мышечном волокне *m. flexor digitorum brevis* крысы) было показано наличие  $\alpha$ -субъединиц потенциалзависимых кальциевых каналов Cav1.3 в сателлитных клетках (Почаев и др., 2013). В этой работе продемонстрировано, что при действии карбахола – активатора ацетилхолиновых рецепторов, через каналы Cav1.3 в сателлитных клетках ионы кальция поступают в мышечное волокно.

Волокна с прилежащими сателлитными клетками были изолированы методом ферментативной обработки. Затем к мышечным волокнам с сателлитными клетками добавляли кальциевый зонд Fura-2 AM и регистрировали кинетику входа ионов кальция при действии карбахола. Было установлено, что после добавления карбахола резко (в течение 1-2 секунд) возрастал вход этих ионов в одну из сателлитных клеток на мышечном волокне. Вход кальция в данную клетку завершался локальной гиперконтракцией волокна. Этот процесс протекал обычно в центральной области (вероятно, рядом с синаптическим контактом) и носил необратимый характер. Полученные результаты дают основание предполагать, что через сателлитные клетки осуществляется быстрый мощный вход  $Ca^{2+}$  в мышечное волокно, тогда как на других участках волокна эти ионы входят значительно медленнее.

Мы предполагаем, что в транспорте ионов кальция из сателлитной клетки в мышечное волокно принимают участие мембранные нанотрубки, содержащие актиновые волокна. Присутствие подобных нанотрубок было показано в работе Тэви и коллег (Tavi et al., 2010). Наличие местной гиперконтракции мышечных волокон, обусловленной поступлением ионов кальция из сателлитной клетки, может приводить к повреждению сократительного аппарата волокна и являться причиной тонических спазмов.

## **Изучение особенностей метаболизма 5-аминолевулиновой кислоты в глиомах головного мозга человека**

Пустогаров Н.А.<sup>1,2</sup>, Пантелеев Д.Ю.<sup>1</sup>, Рыбалкина Е.Ю.<sup>5</sup>, Горяйнов С.А.<sup>4</sup>, Копылов А.М.<sup>3</sup>, Коновалов А.Н.<sup>4</sup>, Павлова Г.В.<sup>1,2</sup>

1. *ФГБУН Институт биологии гена РАН, Москва, Россия*
2. *ООО «Апта-фарм»*
3. *Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
4. *НИИ нейрохирургии имени академика Н.Н.Бурденко, Москва, Россия*
5. *НИИ Канцерогенеза ФГБУ Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина РАМН, Москва, Россия*

Цель исследования – С помощью молекулярно-генетических методов и иммуноцитохимии выявить особенности метаболизма 5-АЛК в флуоропозитивных и флуоронегативных глиомах головного мозга человека, влияющие на накопление протопорфирина IX в клетках в условиях избыточной концентрации экзогенной 5-АЛК.

Глиома – опухоль, входящая в гетерогенную группу и имеющая нейроэктодермальное происхождение. Хирургическое удаление опухоли является одним из основных методов борьбы с глиомами головного мозга. Среди методик повышения эффективности терапии наиболее перспективной является фотодинамическая диагностика, которая основана на флуоресценции протопорфирина IX. Протопорфирин IX накапливается в клетках новообразований после системного введения 5-аминолевулиновой кислоты (5-АЛК). Это позволяет с высокой точностью удалять опухолевые ткани, максимально сохраняя здоровые смежные мозговые структуры. 5-АЛК – естественный источник синтеза протопорфирина IX – светопоглощающего митохондриального хромофора, предшественника гемма. Было обнаружено, что флуоресценция протопорфирина IX коррелирует со скоростью пролиферации клеток опухоли, неоангиогенезом. Вместе с тем, данный метод имеет ряд недостатков, среди них то, что в некоторых видах опухолей, особенно в метастатических опухолях головного мозга не наблюдается флуоресценция 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX. Из литературных источников, при применении 5-АЛК, видимая флуоресценция наблюдается в 70% случаев. Синтез протопорфирина IX катализируют специальные ферменты: ALAD, HMBS, UROS, UROD, CPOX, PPOX, FECH. Для изучения синтеза данных ферментов в клетках обладающих и не обладающих флуоресцирующей способностью получена коллекция тканей глиом с охарактеризованной этиологией, а также охарактеризованная по флуоропозитивности и флуоронегативности. Проведена иммуногистохимическая оценка полученных тканей глиом. Получены первичные клеточные культуры из тканей глиом человека и проведен молекулярно-генетический анализ полученных клеточных культур глиом человека методом ПЦР в реальном времени. Анализ RT-PCR флуоропозитивных образцов показал преимущественно высокий уровень мРНК гена кодирующего CPOX (копротопорфириноген оксидаза) и его связь с сильной флуоресценцией ткани.

## Влияние клеток Сертоли на дифференцировку сперматогоний хряка *in vitro*

Савченкова И.П.

ГНУ Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко  
Россельхозакадемии, Москва, Россия [s-ip@mail.ru]

Подобно другим сложным органам, семенник млекопитающих состоит из многих клеточных типов, которые находятся между собой в тесном контакте. Все взаимодействия между клетками направлены на то, чтобы получить в конечном итоге гормон и высокоспециализированную гамету - спермий. Механизм и сигнальная программа таких взаимодействий, до сих пор до конца не изучена. Клетки Сертоли (КС) признаны ключевыми в процессе сперматогенеза. Однако роль их в обновлении и дифференцировке стволовых половых клеток млекопитающих *in vitro* изучена недостаточно. Представляло интерес оценить влияние КС при культивировании сперматогоний хряка в течение 35 сут (полный цикл сперматогенеза у хряка *in vivo*). Для этого очищенную популяцию сперматогоний, выделенную из яичек хряков 48 сут возраста высевали на фидерный слой, представленный КС. В экспериментах использовали незрелые КС, выделенные из этих же тестикул, которые характеризовались наличием липидных везикул, что подтверждалось окраской жировым красным О. В результате было показано, что краткосрочное культивирование сперматогоний хряка в присутствии КС приводит к одновременной пролиферации сперматогоний и их дифференцировке, как в естественных условиях. На 7 сут наблюдали объединение клеток в группы, формирование цепочек и суспензионных кластеров сперматогенных клеток, представленных предположительно сперматоцитами I-го порядка. Экспрессия гена Nanog в экспериментальных клеточных клонах, полученных при краткосрочном культивировании сперматогоний в присутствии КС, превышала экспрессию этого гена в свежеизолированных половых клетках в 200 раз, а гена Vasa в 350 раз (ПЦР-РВ, ~~XX~~ Ct-метод). Одну часть формируемых суспензионных кластеров сперматогенных клеток переносили на пластик, а другую часть продолжали культивировать в присутствии КС без смены среды. В результате было установлено, что при более длительном культивировании этих клеток на КС, происходит процесс дифференцировки половых клеток и формирование на 30-33 сут единичных подвижных спермиев хряка. Клеточная популяция на этом этапе характеризовалась гетерогенностью. При переносе же сперматогенных клеток, которые находились в суспензии, в чашки Петри, и культивировании их в ростовой среде на пластике в течение 3–7 сут, наблюдали формирование жгутика у всех клеток, что могло свидетельствовать об их дифференцировке в удлинённые сперматиды. Процесс формирования спермиев останавливался после 7 сут культивирования в этих условиях. Таким образом, было установлено, что использование КС для совместного культивирования способствует процессу одновременного размножения и получения сперматогониевых клонов хряка, так и дифференцировке их в направлении сперматогенеза. Краткосрочное культивирование сперматогоний типа А хряка, а затем перенос на пластик способствует дифференцировке и формированию гомогенной популяции специализированных половых клеток. Дальнейшие исследования в данном направлении, направленные на созревание этих клеток *in vitro*, позволят разработать новую систему для получения из ранних половых клеток в культуре чистой популяции зрелых гамет, что, несомненно, представляет ценность для сохранения редких и исчезающих видов животных.



# PI3-киназный путь передачи сигнала участвует в регуляции миграции и пролиферации NIH-3T3 фибробластов по редокс-зависимому механизму

Сагарадзе Г.Д., Ждановская Н.Д., Тюрин-Кузьмин П.А., Морозов Я.И., Сухова А.А., Воротников А.В.

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

**Введение.** Заживление ран – важный физиологический процесс. На стадиях, предшествующих репарации, происходит окислительный стресс. В ходе последующей регенерации фибробласты мигрируют в область повреждения и пролиферируют там под влиянием тромбоцитарного фактора роста (Platelet Derived Growth Factor, PDGF). Эпителиальные клетки формируют поверхностный слой под воздействием эпидермального фактора роста (Epidermal Growth Factor, EGF). PI3-киназный каскад и Ras/ERK1/2 MAP-киназный каскад активируются PDGF, а EGF активирует только Ras/ERK1/2 MAP-киназный каскад. Эти пути передачи сигнала вовлечены в миграцию и пролиферацию фибробластов. Известно, что окислительный стресс и репарация пересекаются во времени и пространстве. Показано, что пероксид водорода, метаболит активных форм кислорода, может играть роль вторичного посредника. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стимулирует процессы миграции или пролиферации в разных клетках. Также при стимуляции рецепторов к PDGF наблюдается сборка мембранных комплексов NADPH-оксидазы (NOX), являющейся основным продуцентом пероксида водорода. Данная работа посвящена поиску взаимосвязей между NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и активированных PDGF или EGF миграцией и пролиферацией NIH-3T3 фибробластов.

**Цели.** Выяснить механизмы редокс-зависимой регуляции и пролиферации NIH-3T3 фибробластов.

**Результаты.** В первую очередь было выявлено влияние PDGF и EGF на миграцию и пролиферацию NIH-3T3 фибробластов. Опыты показали, что PDGF и EGF стимулируют пролиферацию этих клеток, но лишь PDGF стимулирует их миграцию. Далее мы выяснили, какие пути передачи сигнала активируются этими факторами роста при миграции и пролиферации NIH-3T3 фибробластов. Оказалось, что в PDGF-зависимой стимуляции этих процессов задействованы по крайней мере три интересующих нас пути: NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PI3-киназный и ERK1/2-киназный. Однако активация пролиферации под действием EGF не связана с активацией PI3-киназного пути. Чтобы понять, как взаимосвязаны EGF-зависимые пути передачи сигнала и продукция пероксида водорода, были проведены эксперименты по прижизненной визуализации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при добавлении EGF. Как оказалось, в NIH-3T3 фибробластах EGF не стимулирует продукцию NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Для более подробного изучения взаимодействия PDGF и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> была проведена визуализация H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> подобным образом, но при добавлении PDGF. В ходе работы выяснилось, что PDGF поддерживает продукцию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> во времени, которая, вероятно, NOX, зависима. Чтобы прояснить подробнее механизм взаимодействия NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и PDGF, были проведены опыты по выявлению взаимосвязи между продукцией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и различными PDGF-зависимыми путями передачи сигнала: PI3-киназным и ERK1/2-киназным. Полученные данные показывают, что NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> поддерживает стимуляцию PI3-киназного каскада, но не ERK1/2-киназного.

**Вывод.** NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> стимулирует миграцию и пролиферацию, опосредованные PDGF. Из PDGF-зависимых путей передачи сигнала NOX/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> активирует PI3-киназный путь.

# Эффект одновременной экспрессии фактора роста эндотелия сосудов VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 на индукцию ангиогенеза *in vitro* и *in vivo*

Салафутдинов И.И., Катина М.Н., Черенкова Е.Е., Ризванов А.А

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия [sal.ilnur@gmail.com]

Одной из важных задач в области регенеративной медицины является восстановление утраченных и поврежденных структур организма. С целью стимулирования регенерации тканей активно исследуется возможность доставки в область повреждения различных терапевтических генов (ангиогенных, нейротрофических факторов, молекул адгезии и др.) в составе плазмидных генно-инженерных конструкций.

В ходе данной работы нами были разработаны оптимизированные генетические конструкции на основе двухкасетной плазмиды pBudCE4.1 одновременно и независимо экспрессирующие фактор роста эндотелия сосудов человека (VEGF, изоформа 165) и основной фактор роста фибробластов человека (FGF2). Выбранные факторы играют ключевые роли в индукции ангиогенеза и поддержании структурной функциональности вновь образованных сосудов как *in vitro*, так и *in vivo*. Также, была показана экспрессия клонированных генов в ходе иммуноцитологического исследования вестерн блотинга и иммуноферментного анализа.

Биологический эффект среды собранной с генетически модифицированных клеток HEK293T был оценен на модели паракринной стимуляции эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Было установлено, что генетически модифицированные клетки HEK293T секретируют в культуральную среду различные факторы, в том числе рекомбинантные белки, которые в свою очередь усиливают пролиферацию клеток HUVEC по сравнению с культуральной средой собранных с нетрансфицированных клеток и с клеток трансфицированных плаزمидами (pEGFPN2) содержащими ген репортерного белка – EGFP (контрольные группы).

Также было проведено исследование влияния двухкасетной экспрессионной плазмиды на процесс локального ангиогенеза *in vivo*. С этой целью экспериментальным животным (беспородные крысы) подкожно вводили клетки линии HEK293T трансфицированные плазмидным вектром pBud-VEGF165-FGF2, pEGFPN2 или не трансфицированные клетки в составе экстраклеточного матрикса – матригель. Спустя 7 дней с момента введения клеток, на этапе забора материала была выявлена повышенная васкуляризация в зоне введения клеток, трансфицированных плазмидой pBud-VEGF165-FGF2 по сравнению с зоной введения клеток контрольных групп. При исследовании гистологических срезов матригеля окрашенных гематоксилином-эозином выявлена повышенная плотность сосудов окружающих тканей. При этом в группе с введением клеток, трансфицированных pBud-VEGF165-FGF2, развивающиеся сосуды были более крупными по сравнению с группами контроля. В ходе иммуногистохимического анализа была установлена локальная экспрессия рекомбинантного белка EGFP и сверхэкспрессия VEGF. При этом экспрессия EGFP и VEGF строго совпадала с локализацией трансплантированных клеток позитивных в отношении к ядерному антигену человека (HNA).

Полученные данные позволяют говорить об эффективности разработанной двухкасетной плазмиды pBud-VEGF165-FGF2 для стимулирования ангиогенеза и возможных перспективах ее применения при терапии ишемических заболеваний.

## Секреторная активность генетически модифицированных стволовых клеток человека

Салафутдинов И.И.<sup>1</sup>, Соловьева В.В.<sup>1</sup>, Черенкова Е.Е.<sup>1</sup>, Мартынова Е.В.<sup>1</sup>, Хайбуллина С.Ф.<sup>2</sup>, Ризванов А.А.<sup>1</sup>

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

2. Институт Уитермота-Питерсена, Рено, США

[sal.ilnur@gmail.com]

**Цель исследования:** Оценить влияние генетической модификации на цитокиновый профиль стволовых клеток выделенных из жировой ткани человека

**Материалы и методы:** Стволовые клетки из жировой ткани (СКЖТ) были выделены из липоаспирата в ходе ферментативного расщепления раствором коллагеназы. Клетки культивировали на полноценной среде  $\alpha$ MEM. Фенотипирование полученных клеток проводили методом проточной цитометрии. Трансфекцию СКЖТ плазмидными конструкциями проводили с помощью реагента TurboFect. Анализ цитокинов проводили с использованием коммерчески доступных флуорофор конъюгированных микросфер MILLIPLEX® MAP. Растворимые молекулы цитокинов в супернатанте оценивали с использованием составной панели содержащей следующие аналиты: IL-1 $\beta$  – интерлейкин-1 бета, IL-2 – интерлейкин-2, IL-8 – интерлейкин-8, IL-10 – интерлейкин-10, IL-12 – интерлейкин-12, MCP-1 – моноцитарный хемотаксический белок 1 типа (Mip1pore).

**Результаты исследования:** В ходе исследования из жировой ткани человека были выделены и культивированы СКЖТ, по своим морфологическим и фенотипическим свойствам аналогичны мезенхимным стволовым клеткам (МСК) человека. Клетки имели фибробласто-подобную морфологию, были способны к длительной пролиферации *in vitro*. С помощью проточной цитофлуориметрии было установлено, что большинство клеток, третьего пассажа, экспрессируют поверхностные антигены характерные для МСК человека: CD29, CD73, CD90, CD105 и CD166, в тоже время маркеры дифференцировки CD14, CD45, CD133 и CD34 характерные для гемопоэтических клеток экспрессировались в минимальном количестве. В представленном исследовании мы трансфицировали СКЖТ плазмидными векторами. Эффективность трансфекции оценивали по экспрессии рекомбинантного белка EGFP в ходе флуоресцентной микроскопии. При этом наблюдали зелёную флуоресценцию генетически модифицированных клеток. Визуально, порядка 50-60% генетически модифицированных клеток экспрессировали репортерный ген – EGFP. С целью обнаружения различных молекулярных детерминант секретируемых генетически модифицированными и нативными СКЖТ нами был проведен количественный мультиплексный иммуноферментный анализ ряда целевых белков. При анализе полученных данных, было установлено, что нативные и генетически модифицированные СКЖТ на фоновом уровне секретируют про-воспалительные цитокины – IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-12 и противовоспалительный цитокин – IL-10. Во всех исследованных группах была обнаружена секреция клетками хемокинов IL-8 и MCP-1. При этом, уровень секреции данных факторов СКЖТ генетически модифицированных конструкцией pBud-VEGF165-FGF2 или pBud-VEGF-EGFP была значительно выше, чем в не трансфицированных клетках, и в клетках трансфицированных pEGFPN2. Данное обстоятельство может свидетельствовать в пользу того, что сверх-экспрессия клетками VEGF повышает их провоспалительный потенциал.

## **Морфофункциональный анализ действия аллогенных мезенхимальных стволовых клеток на саркому М-1**

Севаньяева Л.Е., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Бандурко Л.Н., Яковлева Н.Д., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш.

*ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск, Россия*

В настоящее время большое внимание уделяется не только изучению терапевтического потенциала мезенхимальных стволовых клеток (МСК), но и вопросам безопасности их применения в клинической практике. Особое внимание придается изучению механизмов действия костномозговых стромальных клеток на злокачественные новообразования. Ранее нами было показано, что однократное введение МСК животным-опухоленосителям оказывало онкомодулирующее действие на рост перевивных опухолей. Кратковременная стимуляция роста опухолевых узлов в ранние сроки после введения МСК обычно сменялась последующим их торможением.

В данной работе изучали влияние аллогенных МСК на функциональную морфологию саркомы М-1, привитой под кожу голени белых беспородных крыс. На 11 сутки после имплантации саркомы животным опытной группы в хвостовую вену вводили  $1,5 \times 10^6$  МСК, полученных культивированием клеток костного мозга половозрелых крыс Вистар. Кроме того, на 11 и 13 сутки роста опухолей 5 крысам на каждый срок в/в вводили МСК, предварительно меченые *in vitro* бромдезоксисуридином (BrdU). Для мечения пролиферирующих клеток на 3-и сутки культивирования в ростовую среду на 24 часа добавляли стерильный концентрированный реагент BrdU («Zymed», 1 : 100). Через 1 и 3 суток этих крыс выводили из опыта для изучения распределения и локализации меченых МСК. Методы исследования включали иммуноокрашивание на PCNA и BrdU.

Через 6 суток после введения МСК средний объем опухолей у животных опытной группы был выше на 21% ( $p > 0,05$ ). При микроскопическом исследовании этих новообразований обращали на себя внимание локальные участки разрастания соединительной ткани по периферии опухолевых узлов с отчетливым вращением сосудов в паренхиме опухолей. Усиление васкуляризации было особенно выражено со стороны подкожной соединительной ткани. В этих же зонах отмечались признаки инвазии клеток новообразования в здоровые ткани. При окрашивании серийных срезов на PCNA в краевой зоне опухолевых узлов выявлялись очаги повышения пролиферативной активности опухолевых клеток, а также интенсивная пролиферация фибробластов и эндотелия сосудов, что характерно для усиления ангиогенеза и строобразования. Иммуногистохимический анализ показал, что через 1 сутки после введения МСК, меченые BrdU, выявлялись, как правило, периваскулярно в зонах ангиогенеза по периферии опухолевых узлов диаметром более 6 мм и содержащих очаги спонтанного некроза. Очень редко меченые клетки можно было видеть возле сосудов в глубине паренхимы опухолей. Через 3 суток клетки с явно сниженной интенсивностью иммуноокрашивания на BrdU определялись крайне редко и вновь, в основном, периваскулярно. Эти клетки визуализировались в зоне локализации перицитов, а низкая интенсивность иммуноокрашивания их ядер на BrdU свидетельствовала об эффекте разбавления метки, которая обычно наблюдается после нескольких последовательных делений пролиферирующих клеток. Избирательной миграции мезенхимальных стволовых клеток в паренхиму саркомы мы не обнаружили.

Согласно полученным результатам, морфологическим эквивалентом активирующего действия МСК на рост саркомы М-1 являлось повышение общей фракции пролиферирующих опухолевых клеток, опосредованное усилением перитуморального ангиогенеза.

# Некоторые биологические характеристики и эффекты лизата тромбоцитов доноров как ростовой добавки для безопасного культивирования клеток

Сергеева Н.С.<sup>1</sup>, Васильев А.В.<sup>2</sup>, Шанский Я.Д.<sup>1</sup>, Свиридова И.К.<sup>1</sup>, Кирсанова В.А.<sup>1</sup>, Ахмедова С.А.<sup>1</sup>, Кувшинова Е.А.<sup>1</sup>

1. ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена» Минздрава России, Москва, Россия
2. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН, Москва, Россия

Совершенствование и внедрение в клиническую практику методов клеточной терапии и тканевой инженерии в различных областях медицины диктует необходимость разработки безопасных (в частности, исключающих контакт с ксеногенными продуктами) методик масштабирования различных видов клеток (в том числе, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, ММСК), предназначенных для введения пациентам. Таким образом, запрет использования при разработке клеточных продуктов эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и сложности культивирования клеток в бессывороточных средах обосновывают актуальность задачи разработки адекватной стимулирующей добавки к ростовым средам. С этих позиций тромбоциты доноров и их лизат (ЛТ) представляется весьма перспективным материалом, т.к. известно, что тромбоциты содержат целый спектр биологически активных веществ, среди которых молекулы адгезии, хемокины и многочисленные факторы роста, влияющие на процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

В данной работе отработана методика получения ЛТ из тромбоцитарной массы доноров, определены концентрации и проведен сравнительный анализ клинических биохимических показателей, факторов роста – PDGF (AA, BB и AB-изоформы), TGF $\beta$ , VEGF, IGF-1, гормонов (инсулин, эстрадиол, тестостерон) в образцах ЛТ (n= 46) и ЭТС (n= 4 ) и разработана процедура пулования образцов ЛТ. Концентрации щелочной фосфатазы, ЛДГ, креатинина и показатели минерального обмена в ЛТ оказались ниже, а показатели липидного, белкового обмена выше, чем в ЭТС. Уровень факторов роста и гормонов в ЛТ существенно превышал их содержание в ЭТС: PDGF AA – в 49 раз, PDGF AB – в 148 раз, VEGF и TGF $\beta$  – в 19 раз, IGF – в 1,7 раз, эстрадиола – в 2,3 раза, тестостерона – в 27 раз и инсулина – в 4,9 раза. В экспериментах *in vitro* с помощью МТТ-теста проведена оценка влияния ЛТ (как добавки к ростовой среде) на динамику роста культуры фибробластов человека (ФЧ) и ММСК из жировой ткани (ЖТ) пациентов в сравнении с ЭТС. Показано, что прирост популяции ФЧ и ММСК при культивировании в присутствии ЛТ происходит существенно эффективнее по сравнению с ЭТС. Так, при ступенчатой замене ЭТС на ЛТ в среде культивирования (0%, 25%, 50%, 75% и 100%) прирост ММСК на 7-е сут. (по отношению к 1-м) составил 154,8%, 206,6%, 228,2%, 367,7% и 396,5%, соответственно. Выявлено сокращение времени достижения состояния конфлюэнтного монослоя культурами ФЧ и ММСК при культивировании в среде с добавлением ЛТ по сравнению с ЭТС за счет уменьшения времени их удвоения: 30,7 vs 41,0 ч для ФЧ и 28,9 vs 56,0 ч для ММСК. При исследовании пластичности ММСК ЖТ в адипо- и остеогенном направлениях не обнаружено различий в сроках наступления индуцированной дифференцировки и ее интенсивности между культурами ММСК с использованием в качестве ростовой добавки 10% пулованного образца ЛТ и 10% ЭТС.

Полученные данные дают основание надеяться на то, что ЛТ может стать полноценной нексеногенной культуральной добавкой к ростовой среде, способной поддерживать пролиферацию ММСК и других типов клеток *in vitro*. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ 12-03-00704а.

## **Пептиды, полученные из мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, улучшают гистологическую картину при острой печеночной недостаточности**

Склифас А.Н.<sup>1</sup>, Темнов А.А.<sup>2</sup>, Вагабов А.В.<sup>2</sup>, Лебедев М.П.<sup>2</sup>, Порог К.А.<sup>2</sup>

1. ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
2. НИИ Скорой помощи им. Н.В.Склифосовского, Москва, Россия

**Актуальность.** Острая печеночная недостаточность (ОПН) – состояние, летальность при котором может достигать - 80%. Причины данного состояния могут быть различными, однако существует все больше доказательств, что в основе развития ОПН лежит воспалительная реакция, приводящая к микроциркуляторным нарушениям, выраженному апоптозу и оксидативным нарушениям. Ацетаминофен (парацетамол) - индуцированная гепатотоксичность является весьма распространенной в мире и одной из основных причин ОПН в США и странах Европы. Было неоднократно продемонстрировано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают противовоспалительным, анти-апоптотическим, пролиферативным эффектом. Причем, в первую очередь, данный эффект приписывается, так называемым, паракринным механизмам действия. Учитывая, что патологическое действие ацетаминофена (АРАР) на печень обусловлено формированием мощного воспалительного процесса, оксидативного стресса и выраженным апоптозом, мы предположили, что разработанный в нашей лаборатории пептидный препарат, полученный на основе МСК костного мозга, может оказывать положительный эффект при АРАР-индуцированной ОПН.

**Материалы и методы.** Для моделирования ОПН мышам вводился в/б в высокой дозе АРАР. Для лечения ОПН после АРАР в/б вводили пептидный препарат, полученный из культивированных МСК. Материалы для гистологического исследования забирали через 6, 24 часа, и через 7 суток после введения АРАР.

**Результаты.** При гистологическом исследовании печени было выявлено, что под воздействием АРАР по сравнению с интактными животными наблюдались выраженные явления белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, признаки воспаления и апоптоза, а также обширные участки некрозов. К 7 суткам расширяются зоны некрозов и нарастает жировая дистрофия гепатоцитов. В то же время, введение животным пептидного препарата, полученного из культивированных МСК, улучшало гистологическую картину. В первые 6 часов после введения АРАР зоны некроза и апоптоза были значительно менее обширными по сравнению с не леченой группой, дистрофические и воспалительные изменения были менее выраженными, ткань в значительно большей мере сохранила свою архитектуру по сравнению с не леченым контролем. Через 24 часа по сравнению с предыдущим сроком исследования повреждение гепатоцитов распространяется, однако выраженность и распространенность дистрофических изменений значительно меньше, чем в контрольной группе. Через 7 суток в ткани печени отчетливо определяется балочное строение долек, грубых дистрофических повреждений и некрозов выявлено не было, в целом, морфологическая картина была близка к нормальному строению печени. Кроме того, через 24 часа после введения АРАР наблюдалось выраженное увеличение числа митотически-активных клеток при введении пептидных препаратов.

**Выводы.** Пептиды, полученные на основе МСК костного мозга, значительно снижают уровень воспаления, уменьшают зоны некроза, а также ускоряет регенеративные процессы в печени, после воздействия токсина.

## Система для направленного внесения мутаций экспансии тринуклеотидных повторов

Сорокин М.А.<sup>1,2,3\*</sup>, Медведев С.П.<sup>1,2,3</sup>, Покушалов Е.А.<sup>2</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3</sup>

1. ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия
2. ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени ак. Е.Н. Мешалкина, Новосибирск, Россия
3. ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

\* [sorokin@bionet.nsc.ru]

Моделирование заболеваний человека с использованием плюрипотентных стволовых клеток имеет существенные преимущества по сравнению с традиционными моделями на животных. Используя клеточные модели, можно свести к минимуму влияние генетических различий как между видами, так и между индивидуумами; можно внести в геном исследуемых клеток практически любые мутации, что особенно актуально для редких заболеваний; путём направленной дифференцировки можно получить доступ к типам клеток, извлечение которых при помощи биопсии затруднено.

Задачей данной работы является моделирование болезни Хантингтона и синдрома ломкой Х-хромосомы – нейродегенеративных заболеваний человека, вызываемых динамическими мутациями экспансии тринуклеотидных повторов в генах HTT и FMR1, соответственно.

Для проведения гомологичной рекомбинации были созданы донорные плазмидные конструкции, содержащие тракт тринуклеотидных повторов известной длины, фланкированный плечами гомологии к генам HTT или FMR1. Нарращивание тракта тринуклеотидных повторов, а также его объединение с плечами гомологии произведено путём последовательного Golden Gate клонирования, что позволило создать фрагмент донорной ДНК, не содержащий посторонних последовательностей.

Для направленного повышения эффективности гомологичной рекомбинации в локусах генов HTT и FMR1 человека были созданы искусственные нуклеазы/никазы системы CRISPR/-Cas9, вносящие, соответственно двуцепочечные/одноцепочечные разрывы ДНК вблизи трактов тринуклеотидных повторов. Для проверки работы конструкций, экспрессирующих CRISPR-нуклеазы, их трансфицировали в клетки линии 293T. Из десяти нуклеаз восемь проявили способность направленно вносить двуцепочечные разрывы и могут быть использованы в дальнейшей работе.

## Патоморфологическая характеристика децеллюляризованного каркаса сердца крысы

Сотниченко А.С.<sup>1</sup>, Губарева Е.А.<sup>1</sup>, Гилевич И.В.<sup>1</sup>, Куевда, Е.В.<sup>1</sup>, Попова А.В.<sup>1</sup>, Хааг Й.<sup>2</sup>,  
Юнгеблут Ф.<sup>2</sup>, Крашенинников С.В.<sup>3</sup>, Григорьев Т.Е.<sup>3</sup>, Чвалун С.Н.<sup>3</sup>, Маккиарини П.<sup>1,2</sup>

1. Кубанский государственный медицинский университет, Международный научно-исследовательский клиничко-образовательный центр регенеративной медицины, Краснодар, Россия
2. Каролинский институт, Ведущий центр трансляционной регенеративной медицины (ACTREM), Швеция
3. Курчатовский НБИКС-центр НИЦ "Курчатовский институт", Москва, Россия

**Цель работы:** охарактеризовать структуры децеллюляризованного каркаса сердца крысы.

**Материалы и методы:** в работе использовались взрослые крыс-самцы линии Lewis весом  $180 \pm 16$  г. Децеллюляризация сердца была отработана на 20 органах, 20 животных составили группу нативного контроля. Для проведения децеллюляризации выделяли органокомплексы «сердце-легкие», помещали их в биореактор и начинали ретроградную перфузию жидкости через аорту, а также перфузию жидкости через трахею. Децеллюляризацию производили по модифицированному детергент-энзиматическому протоколу с применением 4% раствора дезоксихолата натрия и ДНК-азы. С целью оценки качества децеллюляризации ткани сердца использовали рутинные методики гистологической окраски (гематоксилином и эозином), окрашивание флуорофором (4',6'-диамидино-2-фенилиндола) DAPI. Качественный состав внеклеточного матрикса (ВКМ) был исследован иммуногистохимическим методом. Сохранность ультраструктуры ВКМ оценивалась с использованием сканирующей электронной микроскопии. Количественную оценку содержания ДНК в нативных и децеллюляризованных тканях производили спектрофотометрически. Сравнительные биомеханические тесты образцов сердца проводили на универсальных испытательных машинах с определением предельной прочности, деформации при предельной прочности и модуля Юнга в виде одноосного растяжения с постоянной скоростью.

**Результаты:** при окрашивании гематоксилином и эозином интактные мышечные волокна, клетки и клеточные ядра не выявлялись. Патологических изменений структуры, ориентации волокон, тинкториальных свойств соединительной ткани обнаружено не было. Иммуногистохимическое исследование внеклеточного матрикса не показало качественных изменений его состава. Основные структурные белки коллаген I и IV типов, ламинин, эластин, фибронектин – были обнаружены в децеллюляризованном матриксе сердца. В то же время молекулы МНС I класса, которые экспрессируются на мембранах всех соматических клеток, внутриклеточный сократительный белок тропомиозин обнаружены не были. По данным сканирующей электронной микроскопии в децеллюляризованных сердцах при сохранности пористой структуры ВКМ клетки не обнаруживались, был обнажен волокнистый матрикс. При количественной оценке уровня ДНК установлено, что при проведении децеллюляризации было удалено около 81% ядерного материала. По данным механического тестирования децеллюляризованные образцы показали более высокие механические характеристики в сравнении с нативными.

**Выводы:** проведение децеллюляризации сердца крысы с использованием модифицированного детергент-энзиматического протокола не приводит к повреждению структур ВКМ, ухудшению механических свойств матрикса и позволяет сохранять его основные структурные белки.



# Паттерн транскрипции белок-кодирующих и регуляторных РНК в плюрипотентных клетках крысы

Стекленева А.Е.<sup>1,2,3\*</sup>, Медведев С.П.<sup>1,2,3</sup>, Васькова Е.А.<sup>1,2,3</sup>, Немудрый А.А.<sup>1,2,3</sup>, Елисафенко Е.А.<sup>1,2,3</sup>,  
Евшин И.С.<sup>4</sup>, Шарипов Р.Н.<sup>4</sup>, Сайфутдинова С.Г.<sup>4</sup>, Кизилова Е.А.<sup>1</sup>, Железова А.И.<sup>1</sup>, Иванова Л.Н.<sup>1</sup>,  
Покушалов Е.А.<sup>2</sup>, Закиян С.М.<sup>1,2,3</sup>

1. ФГБУ Институт цитологии и генетики СО РАН
  2. Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени ак. Е.Н. Мешалкина
  3. ФГБУ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
  4. ФГБУ Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН
- \* [stekleneva@bionet.nsc.ru]

На сегодняшний день существует более 500 инбредных линий крыс, обладающих различным спектром фенотипов, моделирующих развитие заболеваний человека (нейродегенеративных заболеваний, болезней обмена веществ и т.д.). Технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) крысы, путем введения в дифференцированные клетки факторов для репрограммирования в комплексе с использованием крыс в качестве моделей патогенеза различных заболеваний человека, может создать перспективную базу по исследованию возможностей и безопасности применения заместительной клеточной терапии в лечении заболеваний. Однако в настоящее время существует ограниченное количество данных о свойствах плюрипотентных клеток крыс (паттерне экспрессии генов, микроРНК, сигнальных путях и т.д.) без которых исследования в данной области сильно затрудняются. Поэтому получение новых линий плюрипотентных клеток и их детальное изучение является актуальной задачей как в области фундаментальных исследований, так и для изучения возможностей потенциального применения в области биомедицины.

В данной работе впервые был проведен сравнительный анализ транскриптомов панели линий плюрипотентных клеток (ИПСК, ЭСК) и эмбриональных фибробластов (исходных линий ИПСК) крыс линии Brattleboro и WAG. Линия крыс Brattleboro является моделью наследственного гипоталамического несахарного диабета, крысы линии WAG были выбраны в качестве условно «здоровой» линии. Для каждой линии клеток были получены данные высокопроизводительного секвенирования внутриклеточных мРНК (RNA-seq) с использованием платформы Illumina (США), которые отражают количественный и качественный состав транскриптов.

В результате, было показано, что все исследуемые линии ИПСК образуют единый кластер и показывают высокую корреляцию экспрессии между собой (порядка 95%) и линиями ЭСК. В то же время исходные эмбриональные фибробласты, из которых были получены линии ИПСК хорошо коррелируют между собой и формируют отдельный кластер, отличающийся от плюрипотентных клеток. Также был проведен анализ экспрессии микроРНК, показавший высокую корреляцию внутри групп линий клеток и линиями ЭСК и ИПСК, отличные от эмбриональных фибробластов. Также нами был детектирован ряд de novo микроРНК, ранее не описанных у крысы.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что по паттерну транскрипции генов и микроРНК полученные линии ИПСК соответствуют ЭСК. Тем не менее, экспрессия отдельных генов и/или даже групп и микроРНК отличается между ЭСК и ИПСК. Какое влияние оказывают данные различия на свойства ИПСК является предметом отдельного исследования.

# Изучение темновой цитотоксичности нанокompозитных фотосенсибилизаторов на мультипотентных мезенхимных стромальных клетках

Ударцева О.О.<sup>1</sup>, Лобанов А.В.<sup>2</sup>, Андреева Е.Р.<sup>1</sup>, Буравкова Л.Б.<sup>1</sup>

1. ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

2. ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия

В настоящее время мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), благодаря их функциональным особенностям, привлекают внимание многих исследователей, а их пластичность предоставляет широкие возможности использования этих клеток в регенеративной медицине и тканевой инженерии. В то же время в ряде работ последних лет отмечается, что ММСК могут играть важную роль в канцерогенезе, стимулируя ангиогенез в опухолях или снижая чувствительность малигнизированных клеток к индукторам апоптоза. Кроме того, многие исследователи отмечают тропизм ММСК к опухолям и предлагают использовать эти клетки в качестве транспортеров к опухолям различных противоопухолевых агентов. Одним из современных методов лечения злокачественных новообразований является фотодинамическое воздействие – неинвазивный метод, компонентами которого являются вещество-фотосенсибилизатор и низкоинтенсивное лазерное излучение. Кроме того, предпринимаются попытки использовать различные фотоактивные вещества для диагностики различных патологий. Перспективными фотосенсибилизаторами являются вещества ряда фталоцианинов. Для улучшения доставки к клеткам-мишеням разрабатываются их наноформы. В настоящей работе была изучена темновая цитотоксичность нанокompозитных фталоцианинов на ММСК.

ММСК выделяли из жировой ткани человека (жтММСК) и культивировали согласно стандартному протоколу. Нанокompозитные фталоцианины были синтезированы с использованием металлических (Al-, Mg-, Zn-) комплексов фталоцианинов, поливинилпирролидона и наноразмерного кремнезема. Чистоту и индивидуальность кристаллических фталоцианинов подтверждали методом MALDI-масс-спектрометрии на приборе Thermo DSQ II. Для изучения темновой цитотоксичности наночастицы, конъюгированные с фталоцианинами, добавляли в среду культивирования в концентрации 0,05-1 мкг/мл. Жизнеспособность жтММСК анализировали методом МТТ-теста.

Было показано, что ни поливинилпирролидон, ни наноразмерный кремнезем не оказывают влияния на жизнеспособность жтММСК. Были синтезированы новые наноразмерные металлокомплексы фталоцианинов. Mg- и Zn-фталоцианины, конъюгированные с наноразмерным кремнеземом, а также наноразмерный Mg-фталоцианин, стабилизированный поливинилпирролидоном, в концентрациях 0,1-1 мкг/мл оказывали выраженный цитототоксический эффект на жтММСК. Нанокompозитные Al-фталоцианины и наноразмерный Zn-фталоцианин в поливинилпирролидоне не оказывали влияния на жизнеспособность клеток. Таким образом, проанализировав темновую цитотоксичность шести новых наноразмерных фотосенсибилизаторов, можно рекомендовать для дальнейших исследований с целью использования в клинической практике наноразмерные комплексы Al-фталоцианинов и наноразмерный Zn-фталоцианин в поливинилпирролидоне.

Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента РФ СП-6775.2013.4.

# Субпопуляция гетерогенной культуры МСК, отвечающая по механизму кальций-индуцированного выброса кальция

Фадеева Ю.И.<sup>1</sup>, Тюрин-Кузьмин П.А.<sup>1</sup>, Сысоева В.Ю.<sup>1</sup>, Котова П.Д.<sup>2</sup>, Рогачевская О.А.<sup>2</sup>, Колесников С.С.<sup>2</sup>, Ткачук В.А.<sup>1</sup>

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия
2. ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия

Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (МСК) – это гетерогенная популяция фибробластоподобных клеток выделяемая из разных органов (костный мозг, жировая ткань и др.) адгезирующих на пластик, способных к самообновлению и дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [1]. В связи с большим потенциалом МСК для использования в регенеративной медицине, важно иметь подробно описанную популяцию клеток с известным клеточным составом. Полногеномное сканирование выявило в популяции МСК экспрессию большого числа рецепторов к гормонам и факторам роста, которые могут принадлежать разным субпопуляциям клеток. Большинство рецепторов, найденных в культуре МСК, вызывает активацию метаболических путей, в которые вовлечен кальций. Повышение цитоплазматического уровня  $Ca^{2+}$  в ответ на стимуляцию рецептора может происходить либо градуально в зависимости от концентрации агониста, либо по принципу «все или ничего». В одной из субпопуляций МСК кальциевый ответ развивается по принципу «все или ничего» [2]. Известно, что такой тип ответа обусловлен кальций-индуцированным выбросом кальция (CICR) из эндоплазматического ретикулума [3]. Целью данной работы было охарактеризовать эту субпопуляцию на экспрессию маркеров плюрипотентности и апоптоза.

Клетки первичной культуры МСК человека выделенные из подкожной жировой ткани 1-2 пассажей окрашивали кальций-чувствительным флуоресцентным красителем Fluo-8 и хелатором кальция NP-EGTA (o-nitrophenyl EGTA). На короткое время (8-12 с) NP-EGTA стимулировали УФ светом (длина волны 350нм), индуцируя, таким образом, небольшое повышение уровня  $Ca^{2+}$  в цитоплазме всех клеток. Далее при помощи прижизненной цейтраферной съемки наблюдали за изменением внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$  в течение 5 минут после стимуляции. Часть клеток (3-5%) реагировала на небольшое увеличение уровня  $Ca^{2+}$  (фотолиз NP-EGTA) последующим большим по амплитуде повышением концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме.

Ранее нами был показан механизм распространения  $Ca^{2+}$ -сигналов в клетке. В цитоплазме МСК анализировали прохождение внутриклеточной волны  $Ca^{2+}$ , возникающей при локальном фотолизе NP-EGTA. Рассчитана скорость свободной диффузии ионов кальция в геометрически сложном объеме цитоплазмы изучаемых клеток. Согласно расчетам, при пассивной диффузии на распространение сигнала потребовалось бы порядка 100 с. В нашем случае волна  $Ca^{2+}$  проходила по цитоплазме за 1с. Эти данные подтверждают, что цитоплазма изучаемой субпопуляции МСК представляет собой активную среду, в которой сигнал  $Ca^{2+}$  распространяется за счет CICR [2].

После выявления клеток, способных отвечать по механизму CICR, образец фиксировали 10% параформальдегидом. Иммуноцитохимически окрашивали образцы на маркеры плюрипотентности c-kit, Oct 4 и Nanog и каспазу 3 – маркер апоптоза. Затем выявляли наличие искомым маркеров в клетках, способных отвечать по механизму CICR. В результате проведенного анализа показано, что клетки, отвечающие по механизму CICR, не несут маркеров плюрипотентности c-kit, Oct 4 и Nanog и caspase 3.

Таким образом, мезенхимальные стволовые/стромальные клетки, отвечающие по механизму кальций-индуцированного выброса кальция, не являются плюрипотентными или апоптотическими клетками.

1. Friedenstain AJ, et al., 1968. Transplantation
2. Котова П.Д. и др., 2013. Биологические мембраны
3. Bootman M.D.; et al., 2002. Current Biology

# Морфология кожи больных системной склеродермией при трансплантации аутологичных клеток костного мозга

Федотовских Г. В., Аскарров М. Б., Шаймарданова Г. М., Сохарев Е. Ю., Старикова Т. Г., А. А. Жусупова

Национальный научный медицинский центр, Астана, Республика Казахстан

Важную роль в успешном лечении аутоиммунных заболеваний, в том числе и системной склеродермии (ССД), придать клеточной трансплантации стволовых кроветворных клеток с присущими им иммуномоделирующими, морфо-, ангиогенетическими и антифибротическими эффектами.

В цель настоящего исследования входило оценить морфологическое состояние кожи больных ССД при трансплантации культивированных аутологичных клеток костного мозга. Учитывая то, что функциональная и биорегуляторная активность стволовых и прогениторных клеток костного мозга при хронических заболеваниях снижена, восстановление активности достигалось путем прекультивирования их *in vitro*.

Под наблюдением находилось 18 женщин (возраст 27 и 38 лет) с достоверным диагнозом ССД по критериям Американской коллегии ревматологов (ACR, 1980). После клинико-лабораторного обследования проведена аспирация костного мозга из гребня подвздошной кости в количестве 400 мл. Биотехнологическим методом выделена гемопоэтическая фракция стволовых клеток с последующим культивированием их в течение 72 часов в среде IMDM в инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток проводилась системно (внутривенно) в среднем в количестве до 140×10<sup>6</sup> клеток. Клиническую эффективность оценивали по критериям Европейской группы по изучению ССД.

Материалом для морфологического гистологического и электронномикроскопического исследования послужил биопсийный материал кожи, взятый до и после одно- и многократной трансплантации. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилином и эозином, по Массон – трихром. Полутонкие срезы окрашивали метиленовым синим, азуром – 2 и основным фуксином. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу. Исследование проводили на электронном микроскопе Libra 120 фирмы Carl Zeiss. Морфологическая картина кожи больных ССД до лечения характеризовалась выраженным фиброзированием соединительной ткани дермы. На электронномикроскопическом уровне были выделены различные подтипы фибробластов. Отмечено большое число миофибробластов и активированные фибробласты склеродерма- специфической популяции. Микроциркуляторная сеть была облитерирована, придатки кожи атрофированы.

Через три месяца после трансплантации стволовых клеток костного мозга выявлено достоверное уменьшение активности ССД по EScSG с 3,9 до 2,5 баллов. Снижению кожного счета соответствовали морфологические изменения дермы, свидетельствовавшие об усилении процесса биодеградации фиброзной ткани. Уменьшались отложения коллагена. Фибробласты, расположенные в папиллярном слое были представлены дистрофически и деструктивно измененными клетками. Резко увеличивалось количество новообразованных сосудов в верхнем слое с прорастанием в глубокий слой дермы. В области полей кровеносных капилляров было отмечено разрежение фиброзной ткани и выявлено наличие макрофагов и фиброкластов. Таким образом, трансплантация СККМ, обладающих естественной иммуносупрессивной активностью и способствующих устранению иммунного дисбаланса, включала и ауторегуляторные механизмы ремодуляции избыточной соединительной ткани.

## Обратимость старения стволовых клеток и причина роста числа асимметричных делений в интерфолликулярном эпидермисе

Халявкин А.В.

*ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия*  
*ФГБУН Институт системного анализа РАН, Москва, Россия*

При анализе свойств стволовых клеток, существенных для понимания первопричин старения возникают такие вопросы. Возрастные изменения внутриклеточных стволовых клеток это причина или следствие старения организма? Автономно или управляемо снижение активности соматических стволовых клеток при старении? Почему стареют потенциально нестареющие стволовые клетки? На что указывает обратимость старения стволовых клеток? Каков механизм выбора стволовой клеткой между асимметричным и симметричным делением? Динамическое постоянство клеточного состава органов и тканей взрослой особи обеспечивается уравновешенностью апоптоза/некроза с делением соматических стволовых клеток и рекрутированием части из них в дифференцировку. Эти клетки не имеют лимита Хейфлика и, в адекватном микроокружении, могут проявлять неограниченную репликативную активность. Из чего следует, что стволовые клетки потенциально способны поддерживать жизнеспособность организма на необходимом уровне неограниченно долго, как это происходит у нестареющей гидры. Но у большинства многоклеточных организмов баланс между процессами восполнения и убылью клеток с возрастом нарушается. Это приводит к цитопении и старению организма. Поэтому гипотеза о ведущей роли первичного старения стволовых клеток в возрастном замедлении и не полном обновлении тканей находит все больше сторонников. В связи с этим уместно рассмотреть самообновление ткани на примере эпидермиса, стволовые клетки которого локализованы только в базальном слое. С начала 1970-х гг. до середины 2000-х гг. была парадигма, по которой лишь меньшинство базальных клеток являются истинно стволовыми. Остальные базалоциты, названные переходными амплифицирующимися клетками, являются их потомками, коммитированными к дифференцировке. До недавнего времени эта концепция считалась общепринятой (J.Invest.Dermatol. 2002 119 888; J.Invest. Dermatol. 2006 126 1450). Однако еще 30 лет назад, проанализировав данные, лежащие в основе этой концепции, и рассмотрев особенности эпидермального гомеостаза в норме и в патологии, мы пришли к выводу, что базалоциты представляют собой единый клеточный тип. А их гетерогенность по ряду свойств связана не со вступлением части из них на путь дифференцировки, а с нахождением в митотическом цикле или вне его (Извест. АН СССР, сер.биол. 1982 1 156; Извест. АН СССР, сер.биол. 1982 5 778). Недавно этот вывод был подтвержден экспериментально (Nature 2007 446 185; Cell Stem Cell 2007 1 371; Exp.Dermatol 2012 21 249), что позволяет рассматривать все эпидермоциты базального слоя в качестве стволовых клеток. Это важно для понимания принципов локализации стволовых клеток в базальном слое эпидермиса, распределения симметричных и асимметричных митозов, причин их возникновения и т.п. Раз стволовые клетки не ограничены лимитом Хейфлика, то снижение активности клеток базального слоя, приводящее к истончению и частичному паракератозу эпидермиса при старении связано с центральными механизмами регуляции и управления в организме, находящемся вне состояния динамической устойчивости (Усп.геронтол. 1998 2 43; Биохимия 2013 78 1278). Это приводит к неадекватному снижению активности стволовых клеток и замедлению самообновления тканей, влекущему за собой старение организма. Но старение самих стволовых клеток оказалось обратимым и *in vitro* и *in vivo*. Деление базалоцитов было изначально симметрично. В дифференцировку вытеснялись слабоадгезивные G0 клетки. Снижение их числа при росте пролиферации переориентирует часть митозов на асимметричные.

## **Коллагеновый состав стромы органа человека в пренатальном онтогенезе создает основу для создания биоматрикса при развитии органа из стволовых клеток**

Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А., Барановский Ю. Г., Барановский А. Г.

*ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С. И. Георгиевского», Симферополь, АР Крым, Украина*

Становление коллагенового состава волокнистого каркаса поджелудочной железы изучено с помощью метода иммуногистохимии у 114 зародышей человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития, которые были фиксированы формалином и залиты в парафин. Первичными антителами были моноклональные антитела к коллагену I типа (Isotype Ig G1, Chemicon International), коллагену II типа (клон COLL-II, Isotype Ms Ig G1-kappa, Chemicon International), коллагену III типа (Isotype Ig G1, Chemicon International) и коллагену IV типа (клон CIV 22, Dako Cytomation). В качестве растворителя антител использовали раствор Antibody Diluent (Dako Cytomation).

В строме поджелудочной железы первыми появляются коллагеновые волокна третьего типа у зародышей в возрасте 45 суток (16 мм длины) в капсуле. В дальнейшем нежная сеть этих волокон обнаруживается у зародышей в возрасте 46-49 суток (17-20 мм длины) между эпителиальными закладками железы, вокруг главного выводного протока и протоков 1-го порядка. У зародышей в возрасте 50 суток (21 мм длины) формирующийся волокнистый каркас пополняется коллагеновыми волокнами I типа. Они повторяют те же закономерности появления и гистотопографии, что и коллагеновые волокна III типа. В сравнительном отношении коллагеновые волокна III типа всегда преобладают и являются более толстыми. Соотношение коллагеновых волокон I и III типа 1,6:3,3. В 62 суток (зародыши 32 мм длины) в строме поджелудочной железы впервые выявляются коллагеновые волокна II типа. Они тонкие, немногочисленные и их количество заметно не увеличивается до конца изученного периода эмбриогенеза. В 11 недель (зародыши 46-56 мм длины) в базальной мембране кровеносных сосудов, кровоснабжающих поджелудочную железу, впервые обнаруживаются коллагеновые волокна IV типа. В базальной мембране ацинусов и выводных протоков этот вид коллагена отсутствует, хотя известно, что в базальных мембранах этих образований взрослых мышей коллаген IV типа обнаруживается (Jiang F. X. с соавт., 1999).

Таким образом, при создании коллагеновой матрицы для миграции эпителиальных клеток при ветвлении протоков поджелудочной железы необходимо преимущественно использовать коллагеновые волокна третьего типа и в небольшом количестве коллагеновые волокна первого типа.

# Характеристики стромальных клеток-предшественников в костном мозге больных острым лимфобластным лейкозом до и после проведения аллогенной трансплантации стволовых кроветворных клеток

Шипунова И.Н.<sup>2</sup>, Петинати Н.А.<sup>2</sup>, Сац Н.В.<sup>2</sup>, Бигильдеев А.Е.<sup>2</sup>, Дризе Н.И.<sup>2</sup>, Кузьмина Л.А.<sup>1</sup>, Паровичникова Е.Н.<sup>1</sup>, Савченко В.Г.<sup>1</sup>

1. Отделение Трансплантации костного мозга

2. Лаборатория Физиологии кроветворения

ФГБУ "Гематологический научный центр" Минздрава России, Москва, Россия

Гематопролиферативные заболевания, а также высокодозная химиотерапия, применяющаяся для их лечения, затрагивают как кроветворные, так и стромальные клетки-предшественники. Вероятно, изменения кроветворения, происходящие, в частности, при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ), отражаются на состоянии кроветворного микроокружения.

Целью работы было проанализировать изменения, происходящие в стромальных клетках-предшественниках, - колониобразующих единицах фибробластов (КОЕф) – в КМ пациентов с ОЛЛ до и после проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

Аллогенная ТГСК была проведена 7 пациентам (6 мужчин, 1 женщина) после миелоаблативного кондиционирования. КМ аспирировали до начала кондиционирования и в определенные сроки в течение года после аллоТГСК. КОЕф анализировали в стандартных условиях. Относительный уровень экспрессии генов определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени. В качестве контроля использовали КОЕф от 20 доноров КМ для аллоТГСК после получения информированного согласия.

Концентрация КОЕф в КМ пациентов с ОЛЛ до аллоТГСК была снижена на 12% по сравнению с донорами. После аллоТГСК концентрация КОЕф снизилась еще в 5,2 раза по сравнению со значением до аллоТГСК ( $p=0,02$ ). Известно, что КОЕф формируют колонии клеток за счет аутокринной экспрессии основного фактора роста фибробластов (FGF2). Сигнал от FGF2 передается через два рецептора 1 и 2 типа, причем считается, что основным является рецептор 1 типа. Уровень экспрессии рецептора 1 типа фактора роста фибробластов (FGF2) у больных ОЛЛ до аллоТГСК снижен на 27% по сравнению с донорами. После трансплантации он снижается еще в 1,2 раза. Уровень экспрессии рецептора 2 типа снижается у больных по сравнению с донорами в 16 раз до аллоТГСК и в 50 раз после ( $p=0,01$  в обоих случаях). Уровень экспрессии FGF2 у больных до трансплантации повышен почти в 2 раза по сравнению с донорами и снижается в 16 раз после ТГСК. Полученные данные объясняют молекулярные механизмы снижения концентрации КОЕф у больных ОЛЛ после аллоТГСК. Гены маркеров жировой и костной дифференцировок достоверно снижены в КОЕф больных ОЛЛ до аллоТГСК (SPP1 –  $p=0,02$ ; PPARG –  $p=0,01$ ), что указывает на менее дифференцированный статус потомков КОЕф, после ТГСК экспрессия этих генов достоверно увеличивается и становится сравнимой или даже превышает экспрессию этих генов в КОЕф доноров (PPARG –  $p=0,02$ ), т.е. КОЕф «нормализуются» по своему дифференцировочному потенциалу. Уровень экспрессии VMP4 в КОЕф снижен у больных по сравнению с донорами в 30 раз ( $p=0,002$ ), вероятно, из-за повреждающего воздействия опухолевых лимфоцитов. После аллоТГСК он повышается в 100 раз относительно донорского, что, возможно, отражает интенсивное восстановление стромального микроокружения при взаимодействии с нормальными кроветворными клетками.

Таким образом, у больных ОЛЛ наблюдаются множественные изменения в концентрации КОЕф и экспрессии различных генов в их потомках. Некоторые изменения регистрируются на протяжении года после аллоТГСК.

## **Действие мезенхимальных стволовых клеток на выживаемость крыс и репаративные процессы в легких после гамма-облучения**

Яковлева Н.Д., Южаков В.В., Конопляников А.Г., Севаньяева Л.Е., Бандурко Л.Н., Фомина Н.К., Токарев О.Ю., Цыганова М.Г., Ингель И.Э., Лепехина Л.А.

*ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, Обнинск, Россия*

Изучали эффективность действия системно трансплантируемых мезенхимальных стволовых клеток (МСК) взрослого организма на выживаемость крыс и регенеративные процессы в легких после локального гамма-облучения грудной клетки животных в дозе 25 Гр. Крыс Вистар массой 180-200 г подвергали локальному воздействию  $\gamma$ -квантов  $^{60}\text{Co}$  на область грудной клетки на установке «Луч» при мощности дозы 2,7 Гр/мин. Для моделирования условий неравномерного облучения использовали защитное устройство, позволяющее снизить дозовую нагрузку на органы средостения. Из облученных животных были сформированы 2 группы сравнения. Первую группу составили крысы, не получавшие лечения. Животным 2-й группы через 1 сутки после облучения однократно внутривенно вводили  $1,2 \times 10^6$  МСК, полученных культивированием клеток костного мозга крыс Вистар. Пролиферативную активность МСК контролировали путем PCNA-иммуоокрашивания. Для патоморфологического и морфофункционального анализа препаратов легких часть крыс выводили из опыта через 2 месяца после облучения. Методы исследования включали иммуоокрашивание на PCNA, а также компьютерный анализ микроскопических изображений.

За 60-дневный период наблюдений в первой группе выжило 56% облученных особей, в то время как при введении МСК после радиационного воздействия выживаемость животных на этот срок увеличилась до 73%. В период наблюдений до 6 месяцев смертность крыс, получавших костномозговые стромальные стволовые клетки, статистически значимо снизилась в 1,5 раза ( $p < 0,05$ ). Через 2 месяца после облучения в субплевральной зоне наблюдалось уплотнение паренхимы легких, а в периваскулярной и перибронхиальной соединительной ткани – формирование лимфоидных инфильтратов. По данным морфометрии, у облученных нелеченых крыс в зонах развития лучевого повреждения объемная доля альвеолярного воздуха в респираторном отделе легких ( $\rho_A$ ) снижалась в 1,4 раза относительно интактного контроля. Развитие лучевого пульмонита сопровождалось увеличением толщины стенок аэрогематического барьера и усилением пролиферативной активности клеток в межальвеолярных стенках по PCNA практически в 2 раза. На фоне системной трансплантации МСК облученным крысам  $\rho_A$  повышалось с  $50,6 \pm 1,0\%$  до  $64,7 \pm 1,8\%$ . Увеличение объемного содержания альвеолярного воздуха сопровождалось уменьшением толщины стенок межальвеолярного тканевого барьера и снижением индекса PCNA с  $36,5 \pm 3,2\%$  до  $19,2 \pm 1,9\%$  ( $p < 0,01$ ).

Таким образом, результаты исследования показали, что системно введенные крысиные МСК повышают выживаемость особей, облученных в дозе, близкой к полулетальной ( $LD_{50}/60$ ), активизируют процессы восстановления паренхимы легких после лучевого воздействия и снижают выраженность радиационно-индуцированного пульмонита. Есть основание полагать, что терапевтическая эффективность МСК обусловлена их стимулирующим действием на процессы репаративной регенерации клеточных и тканевых структур за счет продукции паракринных факторов в зонах, которые обеспечивают пролиферативный потенциал эндогенных стволовых клеток легких, выживших после воздействия ионизирующей радиации. Не исключено, что ускорение восстановительных процессов может реализовываться за счет индуцированной миграции в легочную ткань собственных МСК из необлученных тканей, по-видимому, преимущественно из костного мозга.



# Молекулярные и клеточные механизмы миграции и хоуминга мезенхимальных стволовых клеток, трансплантированных внутривенно

Ярыгин К.Н., И.В.Холоденко

ФГБУ «Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича» РАН, Москва, Россия

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК), изолированные из различных тканей, служат одним из наиболее активно используемых источников клеточного материала для прееклинических и клинических исследований в области клеточной терапии, что в значительной степени связано с их способностью проникать в ткани из общего кровотока и направленно мигрировать в зоны воспаления, ишемии, травмы и опухолевого роста, а также в тканевые ниши, где концентрируются региональные стволовые клетки.

Последовательность событий, происходящих после внутривенной трансплантации МСК, имеет внешнее сходство с хорошо изученной инвазией тканей белыми клетками крови в ответ на повреждение, а также с проникновением в ткани гемопоэтических клеток. Однако наши собственные эксперименты и результаты других исследовательских групп показывают, что при внешней схожести событий, происходящих в этих случаях, их молекулярные механизмы имеют существенные различия. Следует отметить, что хотя молекулярные регуляторы миграции и хоуминга трансплантированных МСК изучены недостаточно, можно считать доказанным, что миграция происходит по градиенту химокинов, а скорость ее зависит от активности металлопротеаз.

Очень важно то, что МСК, изолированные из разных источников, различаются набором экспрессируемых химокинов, их рецепторов и металлопротеаз, что влияет на направление и скорость миграции. Экспрессия химокинов, рецепторов и ферментов зависит также от способа обработки МСК *ex vivo*, в частности от условий культивирования и количества пассажей. Таким образом, изменяя источник МСК и варьируя условия их процессинга вне организма, в принципе можно получать продукт, наиболее полно отвечающий конкретной терапевтической задаче. С другой стороны, перенос данных по хоумингу, полученных для одного типа МСК, на МСК из других источников, далеко не всегда правомерен.

