

Федеральное агентство по науке и инновациям
Российская академия наук
Российский фонд фундаментальных исследований
Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

**Аутологичные стволовые клетки:
экспериментальные и клинические исследования**

**Материалы Всероссийской научной школы-конференции
для молодежи**

21-26 сентября 2009 года

В сборнике приведены в виде тезисов результаты фундаментальных и прикладных исследований, касающихся аутологичных стволовых клеток, их биологии и потенциального применения в регенеративной медицине. Все публикуемые работы были представлены в рамках Всероссийской научной школы-конференции «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования».

Сборник тезисов предназначен для врачей и биологов, занимающихся исследованиями в данной области, аспирантов и студентов соответствующих специальностей.

СОДЕРЖАНИЕ

Биология нейральных стволовых клеток и возможности реконструкции мозга Александрова М.А.	9
Метод органотипического культивирования тканей глаза позвоночных животных как способ для изучения клеточных источников для регенерации сетчатки Новикова Ю.П., <u>Алейникова К.С.</u> , Поплинская В.А., Григорян Э.Н.	10
Пути дифференцировки трансфецированных мононуклеаров пуповинной крови человека в печени крыс после частичной гепатэктомии <u>Андреева Д.И.</u> , Газизов И.М., Калигин М.С., Йылмаз Т.С., Гумерова А.А.	11
Аутологичные костномозговые стволовые клетки в хирургическом лечении больных ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью <u>Белявская Т.М.</u> , Скридлевская Е.А., Коноплянников А.Г., Самойленко Л.Е., Бугрий М.Е., Сергиенко В.Б., Веселова Т.Н., Колегаев А.С., Акчурин Р.С.	12
Морфологические изменения в печени больных хроническим алкогольным гепатитом после трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток <u>Бурганова Г.Р.</u> , Абдулхаков С.Р., Титова М.А., Гумерова А.А., Йылмаз Т.С., Газизов И.М., Одинцова А.Х., Киясов А.П.	13
Регенерация трубчатой кости при введении суспензии ММСК Буравкова Л.Б., Капланский А.С., Андреева Е.Р., <u>Валюшкина М.П.</u> , Дурнова Г.Н., Логинов В.И., Анохина Е.Б.	14
Современный подход к тестированию клеточных препаратов. Лобынцева Г.С., Дзюблик И.В., Трохименко Е.П., <u>Ворожка И.В.</u>	15
Активация стволового компартмента в печени крыс после частичной гепатэктомии и трансплантации клеток пуповинной крови человека <u>Газизов И.М.</u> , Андреева Д.И., Калигин М.С., Йылмаз Т.С., Гумерова А.А., Киясов А.П.	16
Применение мягких контактных линз для создания тканеинженерной конструкции роговицы человека Макеев О.Г., Коротких С.А., Князева Е.С., <u>Герасимов М.Ю.</u> , Зверева А.С.	17
Аневризма левого желудочка человека как новый источник c-kit- позитивных клеток Дергилев К.В., <u>Гмызина А.И.</u> , Рубина К.А., Парфенова Е.В., Цоколаева З.И., Рахмат-Заде Т.М., Акчурин Р.С., Ткачук В.А.	18
Методические трудности при культивировании клеток совместно с цеолитами <u>Голохваст К.С.</u> , Анисимова А.А., Паничев А.М.	19
Индукция миогенной дифференцировки стромальных клеток основного вещества пупочного канатика <u>Горкун А.А.</u> , Сабурин И.Н., Кошелева Н.В., Ревущин А.В., Павлова Г.В., Репин В.С.	21
Особенности фибробластов постожогового рубца <u>Григорьева О.А.</u> , Сысоева В.Ю., Рубина К.А.	22

Спонтанное изменение фенотипа и кариотипа мезенхимных стволовых клеток человека в культуре <u>Григорян А.С.</u> , Кругляков П.В., Таминкина Ю.А., Пендина А.А., Польшцев Д.Г.	23
Влияние культивирования в бессывороточной среде на морфофункциональные свойства ЛМСК <u>Гринаковская О.С.</u> , Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.	24
Инактивация X-хромосомы в линиях эмбриональных стволовых клеток человека Зайцева Н.С.	25
Разработка технологии лечения нейротрофических язв при сахарном диабете Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., <u>Зверева А.С.</u> , Васильева М.С.	26
Регуляция активности стромальных и провоспалительных клеток под действием альфа-фетопротейна <u>Зубкова Е.С.</u> , Меньшиков М.Ю., Семенкова Л.Н., Дудич Е.И., Парфенова Е.В.	27
Оптическое трехмерное позиционирование и модификация биологических объектов на клеточном и субклеточном уровне Ракитянский М.М., <u>Карагяур М.Н.</u> , Агранат М.Б., Мухамеджанова Д.М., Ашитков С.И., Домогатский С.П., Овчинников А.В., Ситников Д.С., Стамбольский Д.В., Шевелев И.Н.	28
Экспериментальное обоснование применения аутологичных стволовых клеток костного мозга для лечения костных дефектов и генерализованного пародонтита Кауламбаева М.Р.	29
Сравнительный анализ антигенного профиля мезенхимных стромальных клеток из миелоидных органов крыс на разных этапах культивирования <i>in vitro</i> <u>Кожевникова М. Н.</u> , Шевелева О. Н., Старостин В. И	30
Получение и идентификация постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека <u>Кольцова А.М.</u> , Крылова Т.А., Яковлева Т.К., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.	31
Эффект фракционирования дозы облучения ослаблен у стволовых кроветворных клеток мышей, радиорезистентность которых повышена путем предварительного введения животным канцерогена 1,2-диметилгидразина <u>Конопляников А.Г.</u> , Конопляникова О.А., С.Я.Проскуряков С.Я., Кальсина С.Ш., Агаева Е.В., Носаченко В.В.	32
Экспериментальное обоснование и клинический опыт клеточной терапии методом системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при язвенном колите и болезни Крона <u>Конопляников А.Г.</u> , Князев О.В., Лазебник Л.Б., Цыб А.Ф.	33
Лечебный эффект мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и кондиционной среды из под культур МСК при радиационных и радиационно-термических повреждениях <u>Конопляников А.Г.</u> , Проскуряков С.Я., Петров В.Н., Конопляникова О.А., Ульянова Л.И., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш., Семенкова И.В., Агаева Е.В., Носаченко В.В.	34

Влияние различных методов трансплантации мезенхимных стволовых клеток костного мозга на посттравматические процессы в головном мозге крыс

Григорян А.С., Гилерович Е.Г., Павличенко Н.Н., Кругляков П.В., Соколова И.Б., Полянцев Д.Г. 35

Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток в терапии сахарного диабета I типа у крыс

Вийде С. К., Соколова И. Б., Кругляков П. В., Полянцев Д. Г. 36

Влияние внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на посттравматические процессы в головном мозге крыс

Соколова И. Б., Федотова О. Р., Гилерович Е. Г., Павличенко Н. Н., Кругляков П. В., Полянцев Д. Г. 37

Улучшение васкуляризации мышечной ткани после ауто трансплантации стволовых клеток периферической крови больным облитерирующим эндартериитом

Мавликеев М., Табанакова А., Трондин А., Певнев Г., Бурганова Г., Киясов А. . . . 38

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Медведев С.П., Григорьева Е.В., Малахова А.А., Шевченко А.И., Савушкина Д.А., Бернвальд В.В., Соболев И.А., Закиян С.М. 39

Аутологичные нейральные прогениторные клетки на основе пигментированных клеток глаза человека

Милюшина Л.А., Александрова М.А. 40

Кардиомиопатия мышей mdx как модель для изучения терапии миокарда при помощи трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга

Михайлов В. М., Мамаева Г. И., Соколова А. В., Зенин В.В., Фирсанов Ю.В., Веженкова И.В. 41

Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в стромальные клетки жировой ткани мыши.

Молчанова Е.С., Семенова М.Л., Кошелева Н.В., Молчанов А.Ю., Сергеев С.А. . 42

Применение культивируемых стромальных (мезенхимальных) клеток костного мозга в регенеративной медицине

Николаенко Н.С., Цупкина Н.В., Деев Р.В., Матюков А.А., Кухарева Л.В., Бармашева А.В., Вилкова Ю.В., Сахенберг Е.И., Александрова С.А., Старикова Э.В., Шатрова А.Н., Зенин В.В., Пинаев Г.П. 43

Метод органотипического культивирования тканей глаза позвоночных животных как способ для изучения клеточных источников для регенерации сетчатки

Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н. 44

Направленная биоостеоиндукция мезенхимальных клеток костного мозга

Попандуполо А.Г., Оберемко А.В., Оксимец В.М. 45

Управление нейральной дифференцировкой трансплантируемого клеточного материала

Павлова Г.В., Ревещин А.В. 46

β-катенин, 130 и E2F4 формируют функциональный комплекс в мезенхимальных стволовых клетках <u>Петров Н.С., Жидкова О.В., Сериков В.Б., Попов Б.В.</u>	48
Разработка методик дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека в миогенном и хондрогенном направлениях <u>Пономарева А.С., Сургученко В.А., Севастьянов В.И.</u>	49
Получение инсулин-продуцирующих клеток из мультипотентных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика человека <u>Спирова И.А., Ржанинова А.А., Гольдштейн Д.В.</u>	50
Регенерация костей черепа после трансплантации тканеинженерной конструкции на основе аутологичных мультипотентных стромальных клеток, преддифференцированных в остеогенном направлении <u>Волков А.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Арутюнян И.В., Ржанинова А.А., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В.</u>	51
Исследование опухолевого потенциала культур мультипотентных стромальных клеток (МСК) и коммитированных хондробластов человека на лабораторных моделях Nude/Balb и SCID <u>Ржанинова А.А., Мурашов А.Н., Новикова Н.И., Кириенко Е.Е., Гольдштейн Д.В.</u>	52
Первый опыт применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани в области верхней и нижней челюстей <u>Алексеева И.С., Волков А.В., Кулаков А.А., Григорьян А.С., Ржанинова А.А., Арутюнян И.В., Гольдштейн Д.В.</u>	53
Интракоронарная трансплантация мультипотентных стромальных клеток при постинфарктном кардиосклерозе <u>Фатхудинов Т.Х., Слащева Г.А., Большакова Г.Б., Хохлова О.Н., Арутюнян И.В., Илюшкина И.А., Мурашев А.Н., Гольдштейн Д.В.</u>	54
Тканеинженерные конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток костного мозга и пористых полилактидных носителей <u>Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Фатхудинов Т.Х., Попов В.К., Волков А.В., Попова А.В., Баграташвили В.Н., Гольдштейн Д.В.</u>	55
Морфологические изменения в парауретральной области при введении тканеинженерной конструкции на основе стромальной фракции жировой ткани <u>Макаров А.В., Арутюнян И.В., Гольдштейн Д.В.</u>	56
Применение тканеинженерной конструкции для лечения ложных суставов <u>Шустров С.А., Волков А.В., Арутюнян И.В., Петров М.А., Ржанинова А.А., Большакова Г.Б., Гольдштейн Д.В.</u>	57
Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки <u>Ромашенко А.Д., Суздальцева Ю.Г., Кальсин В.А., Ковалев А.В.</u>	58

Сравнительная оценка устойчивости мезенхимальных стромальных клеток к различному содержанию кислорода в среде культивирования <u>Рылова Ю.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.</u>	59
Стволовые клетки эктомеzenхимы зачатка зуба мудрости человека для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний <u>Салафутдинов И.И., Шафигуллина А.К., Ризванов А.А.</u>	60
Формирование хрящеподобных микромасс стромальными клетками костного мозга на гидрофобной поверхности <u>Сахенберг Е.И., Николаенко Н.С., Пинаев Г.П.</u>	61
Регенерация костной ткани после трансплантации аутологичных мезенхимных стромальных клеток <u>Мамонов В.Е., Сац Н.В., Шипунова И.Н., Свинарева Д.А., Ряшенцев М.М., Проскурина Н.В., Дризе Н.И.</u>	62
Пролиферативный потенциал человеческих мезенхимных стромальных клеток (мск) доноров и больных апластической анемией <u>Шипунова И.Н., Петрова Т.В., Свинарева Д.А., Сац Н.В., Дризе Н.И.</u>	63
Сравнение поведения нейтральных стволовых / прогениторных клеток и клеток пигментного эпителия глаза при инъекции <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> <u>Сергеев С.А., Кошелева Н.В., Сабурова И.Н., Ревущин А.В., Семенова М.Л.</u>	65
О возможной роли мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тканеинженерных конструкциях на основе натуральных, синтетических керамических и композиционных материалов при замещении костных дефектов у животных <u>Сергеева Н.С., Франк Г.А., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А.</u>	66
Восстановление структуры нейромышечных соединений скелетных мышц мышей mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга <u>Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М.</u>	67
Результаты применения трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации в сочетании с трансплантацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у повторных больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла <u>Бокерия Л.А., Беришвили И.И., Солнышков И.В., Вахромеева М.Н.</u>	68
Старение вызывает подавление ангиогенных свойств стромальных клеток жировой ткани <u>Старостина Е.Е., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И., Парфенова Е.В., Ткачук В.А.</u>	69
Циркулирующие прогениторные клетки в условиях стимуляции ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей <u>Талицкий К.А., Булкина О.С., Арефьева Т.И., Воробьева О.Н., Балахонова Т.В., Самко А.Н., Филатов Д.Н., Елисеев А.О., Кухарчук В.В., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А.</u>	71
Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на чувствительность лейкоэмических клеток к противолейкемическим препаратам <i>in vitro</i> <u>Татарнинова О.С., Осипова Е.Ю., Румянцев С.А.</u>	72

Локализация пероксида водорода в клетке при активации тирозинкиназных рецепторов <u>Тюрин-Кузьмин П.А., Сафронова Н.М., Воротников А.В., Белоусов В.В.</u>	73
Влияние генерации активных форм кислорода в мезенхимных стромальных клетках на состояние митохондрий и лизосом <u>Ударцева О.О., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.</u>	74
Allogeneic transplantation of chorionic stem-progenitor cells at normothermic reperfusion of kidney received from non-heart beating rats <u>Alexander N. Kharlamov, Ciryil Moers, Jan L. Gbainsky</u>	75
Характер встраивания эмбриональных стволовых клеток после микроинъекции в развитии зародышей мыши <i>in vitro</i> <u>Храмцова Е.А., Капралова И.В.</u>	76
Система ко-культивирования мезенхимальных стволовых клеток и клеток нейробластомы SH-SY5Y: новая модель <i>in vitro</i> для скрининга биологической активности веществ <u>Шафигуллина А.К., Блат Н.Л., Ризванов А.А.</u>	77
Мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови и костного мозга человека как источник «нейросфер» при нейрогенной индукции <u>Шахбазов А.В., Петевка Н. В., Космачева С.М., Картель Н.А., Потапнев М.П.</u>	79
Создание клеточного продукта на основе клеток кожи человека - кератиноцитов и биodeградируемой полимерной плёнки <u>Швед Ю.А., Блинова М.И., Билибин А.Ю., Пинаев Г.П.</u>	80
Генетически модифицированные стромальные клетки жировой ткани, секретирующие VEGF, стимулируют ангиогенез <i>in vivo</i> <u>Шевченко Е.К., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Парфёнова Е.В.</u>	81
Появление маркеров первичных половых клеток в эмбриональных стволовых клетках человека культивируемых в среде обогащенной факторами дифференцировки в условиях отсутствия фидера и сыворотки <u>Шейна Ю.И., Еремеев А.В.</u>	82
Создание линий iPS клеток (стволовых клеток с индуцированной плюрипотентью) из эндотелиальных клеток человека <u>Шутова М.В., Лагарькова М.А., Честков И.В., Богомазова А.Н., Ризванов А.А., Киселев С.Л.</u>	83
Особенности мезенхимальных клеток жировой ткани при вторичной лимфедеме <u>Янкайте Е.В., Повещенко О.В., Ким И.И., Ульянов Е.В., Нимаев В.В., Шумков О.А., Коненков В.И.</u>	84
Функциональная характеристика мононуклеарных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным ростовым фактором <u>Янкайте Е.В., Ким И.И., Повещенко О.В., Хабаров Д.В., Романов А.Б., Покушалов Е.А., Коненков В.И.</u>	85

Биология нейральных стволовых клеток и возможности реконструкции мозга

Александрова М.А.

*Учреждение Российской академии наук Институт Биологии
развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва*

Фундаментальные знания в области нейрогенеза значительно обогатились за последние годы в связи с открытием у млекопитающих и человека в мозге нескольких зон, где происходит постоянный нейрогенез благодаря функционированию клеток со стволовыми свойствами. В мозге нейральные стволовые клетки (НСК) существуют в течение всей жизни и их потомки — нейроны и глия, мигрируют, дифференцируются, встраиваются в нейронные сети и функционируют. Эти открытия предоставили совершенно новую научную базу для изучения регенераторных процессов в ЦНС, основу которых составляют исследования биологии стволовых клеток и их регенераторных потенциалов при эндогенной стимуляции или трансплантации с целью реконструкции поврежденного мозга. Нейротрансплантация малодифференцированных клеток является неоценимым инструментом для изучения роста и дифференцировки клеток нервной системы, формирования межнейрональных взаимодействий и стимуляции восстановительных процессов. НСК при трансплантации могут замещать поврежденные нейроны и стимулировать компенсаторные процессы и нейрогенез в мозге реципиента за счет выделения различных ростовых и трофических факторов. Совершенно очевидно, что источник и условия культивирования стволовых клеток являются важнейшими факторами, в значительной степени определяющими дальнейшую судьбу клеток после трансплантации, а успех этих трансплантаций складывается из способностей прогениторных клеток к переживанию в мозге реципиента, миграции, дифференцировке, интеграции и экспрессии специфических факторов. Приживление и рост нейротрансплантатов представляют собой уникальную форму реализации молекулярно-генетической программы развития, метаболизма и патологии. Расшифровка молекулярных механизмов этих процессов откроет пути для управления реконструкцией в дифференцированном мозге. *Работа поддержана грантами РФФИ № 08–04–00081, Федерального агентства по науке и инновациям № 02.512.12.2008.*

Метод органотипического культивирования тканей глаза позвоночных животных как способ для изучения клеточных источников для регенерации сетчатки

Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н.

Институт биологии развития РАН

Для активации регенерационных потенциалов тканей глаза взрослых позвоночных за счет увеличения пролиферации и изменения фенотипа клеток мы использовали новый подход - органное ротационное культивирование *in vitro* изолированной сетчатки и заднего сектора глаза без сетчатки. Выбранный метод *in vitro* позволяет сохранять клеточное микроокружение, осуществлять долговременное культивирование, а также направленно манипулировать компонентами среды. Для сравнения пролиферативных возможностей клеток источников регенерации использованы два объекта — взрослые тритон и крыса, т.е. животные с высоким и низким потенциалом к регенерации. При культивировании ИС взрослого тритона *Pl. waltl* мы наблюдали миграцию клеток с периферии вовнутрь, в полость сформированных ИС сфероидов, и митозы. Отдельные митотические фигуры были отмечены и в ядерных слоях ИС. Проллиферация клеток ИС приводила к образованию пула нейробластов, способных к дальнейшим делениям, миграции и замещению погибших нейронов. Дополнительно проведенные иммуноцитохимические исследования позволяют отнести пролиферирующие клетки ИС тритона как к прогениторным клеткам ростовой зоны, так и клеткам макро- и микроглии. При культивировании ИС взрослой крысы, на фоне транслокации фоторецепторных клеток вовнутрь и их гибели, имела место пролиферация (BrdU метка и митозы) в наружной и внутренней областях ИС. Источником этих клеток, однако, не была как у тритона периферия сетчатки. Делящимися были макрофаги сетчатки, а также глиальные клетки, локализованные среди нейронов внутреннего ядерного слоя. При культивировании заднего сектора глаза без сетчатки ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) тритона и крысы демонстрировал как сходства, так и отличия. При проведении сравнительного анализа морфологии, пролиферации и экспрессии клетками маркерных специфических белков выяснено, что клетки РПЭ обоих видов животных способны при вымещении приобретать макрофагальный фенотип, а оставаясь в слое экспрессировать пан-нейральные маркеры. Однако только РПЭ тритона, но не крысы был способен к образованию в ряде случаев зачатка сетчатки, состоящего из 1-2-х рядов пролиферирующих и дедифференцирующихся клеток. Разработанный нами впервые подход оказался хорошим инструментом для изучения поведения и сравнения клеток источников регенерации сетчатки у взрослых низших и высших позвоночных.

Пути дифференцировки трансфицированных мононуклеаров пуповинной крови человека в печени крыс после частичной гепатэктомии

Андреева Д.И., Газизов И.М., Калигин М.С., Йылмаз Т.С., Гумерова А.А.

Казанский государственный медицинский университет

Ранее была показана возможность образования гепатоцитов из стволовых гемопоэтических клеток. Но до сих пор не ясно происходит это путем прямой дифференцировки или в процессе слияния.

Целью нашей работы было изучить дифференцировку гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови, трансфицированных геном зеленого флуоресцирующего белка (EGFP), в печени крыс после частичной гепатэктомии (ЧГ).

Исследование проводили на 30 белых беспородных крысах, которым после операции ЧГ в селезенку вводили $1 \cdot 10^6$ ядросодержащих клеток пуповинной крови человека, трансфицированных геном EGFP. Забор органов проводили через 2, 5, 7 суток после операции, фиксировали и заливали в парафин по стандартной методике. Парафиновые срезы печени окрашивали антителами к EGFP и СК 19 (холангиолярный маркер), а также проводили двойное окрашивание антителами к EGFP и СК 19.

При окрашивании антителами к EGFP мы обнаруживали позитивное окрашивание гепатоцитов и синусоидных клеток, а также холангиоцитов. А иммуногистохимическое окрашивание антителами к СК 19 кроме холангиоцитов выявило еще и мелкие округлые клетки с фенотипом гепатобластов. Известно, что зрелые гепатоциты не экспрессируют данный маркер, но ранее была показана экспрессия СК 19 гепатобластами в ходе внутриутробного развития. При двойном окрашивании антителами к EGFP и СК 19 мы видели холангиоциты, экспрессирующие оба маркера и находящиеся в мелких новообразующихся протоках. Кроме того, мы обнаружили и единичные гепатобласты, которые экспрессируют как зеленый флуоресцентный белок, так и СК 19.

Таким образом, генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека участвуют в новообразовании желчных протоков в ходе регенерации после ЧГ. Кроме того, мы показали возможность прямой дифференцировки (а не слияния) гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови человека в гепатоциты в печени крыс после ЧГ.

Аутологичные костномозговые стволовые клетки в хирургическом лечении больных ишемической болезнью сердца с хронической сердечной недостаточностью

Белявская Т.М.¹, Скридловская Е.А.¹, Коноплянников А.Г.²,
Самойленко Л.Е.¹, Бугрий М.Е.¹, Сергиенко В.Б.¹, Веселова Т.Н.¹,
Колегаев А.С.¹, Акчурин Р.С.¹

¹*ФГУ Российский Кардиологический Научно-Производственный комплекс Росздрава, Москва*

²*Медицинский Радиологический Научный центр РАМН, Обнинск*

В последние годы всё большее внимание привлекает новый метод — трансплантация стволовых клеток (СК). Данный метод предложен для улучшения кровоснабжения, сократимости миокарда у больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Цель работы: Изучить безопасность и эффективность интрамиокардиальной трансплантации костномозговых стволовых клеток.

Материалы и методы: В исследование включено 16 пациентов (средний возраст 51 ± 8 лет) с низкой сократительной функцией миокарда левого желудочка (ЛЖ) и поражением коронарных артерий, требующим хирургической реваскуляризации. Культивирование СК костного мозга проводили с применением 5-азациитидина. Интрамиокардиальные инъекции клеточной суспензии (2×10^8 CD34-, CD 45-, CD 117- клеток) выполняли в области рубцового поражения миокарда во время операции коронарного шунтирования.

Результаты: Не выявлено жизнеугрожающих нарушений ритма сердца. Фракция выброса (ФВ) ЛЖ по данным ЭХО-КГ увеличилась с $28,8 \pm 6 \%$ до $35,5 \pm 6 \%$ ($p < 0,05$) через 3 месяца и значимый прирост сохранился через 1 год после операции ($37,7 \pm 6 \%$), кроме того отмечено уменьшение объёмов полости ЛЖ. Данные синхронизированной однофотонной эмиссионной томографии миокарда (СОЭКТ) с Tc99m-МИБИ коррелируют с данными ЭХО-КГ.

Выводы: Процедура имплантации костномозговых стволовых клеток в миокард ЛЖ является безопасной, оказывает благоприятное воздействие на процесс ремоделирования левого желудочка и улучшает сократительную функцию миокарда в сочетании с реваскуляризацией миокарда.

Морфологические изменения в печени больных хроническим алкогольным гепатитом после трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток

Бурганова Г.Р., Абдулхаков С.Р., Титова М.А., Гумерова А.А.,
Йылмаз Т.С., Газизов И.М., Одинцова А.Х., Киясов А.П
Казанский государственный медицинский университет

Цирроз печени — проблема, требующая новых подходов к лечению, поскольку существующая медикаментозная терапия не является достаточно эффективной. Наиболее перспективным в настоящее время является разработка методов клеточной терапии с использованием стволовых клеток (СК).

Целью нашего исследования было оценить морфологические изменения в печени больных хроническим алкогольным гепатитом после трансплантации аутологичных стволовых кроветворных клеток. Исследования проведены в рамках программы «Развитие клеточной медицины в Республике Татарстан». Биоптаты печени 9 больных циррозом печени до и через 3 месяца после введения в чревный ствол аутологичных СК, окрашивали с антителами против альфа-гладкомышечного актина (маркер миофибробластов) и CD34. CD34 отсутствует в эндотелии синусоидов в норме и появляется в этих клетках при капилляризации синусоидов.

Результаты окрашивания оценивали полуколичественным методом. Клетки преимущественно локализовались в перипортальных областях и в инфильтратах портальных трактов. Через 3 месяца после трансплантации уменьшается количество миофибробластов в паренхиме печени, исчезает перисинусоидальный фиброз. На этом фоне эндотелий перестает экспрессировать CD34 и приобретает свойственный ему в норме фенотип.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что трансплантация аутологичных гемопоэтических стволовых клеток в чревный ствол больных хроническим гепатитом в стадии цирроза является безопасной процедурой, способствует уменьшению фиброза и восстановлению эндотелия синусоидов.

Регенерация трубчатой кости при введении суспензии ММСК

Буравкова Л.Б., Капланский А.С., Андреева Е.Р., Валюшкина М.П.,
Дурнова Г.Н., Логинов В.И., Анохина Е.Б.

*Группа клеточной физиологии, лаборатория морфологии
ГНЦ РФ-Институт медико-биологических проблем РАН, Москва*

В настоящее время вызывает интерес возможность использования клеточной инженерии, как способа улучшения восстановления функциональной активности при различных повреждениях опорно-двигательного аппарата. Целью нашей работы было установить влияние однократного введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, культивированных при различном содержании кислорода, на параметры посттравматического остеогенеза.

Работа была выполнена на 60 крысах-самцах линии Вистар, которые были разделены на 4 группы в зависимости от воздействия после перелома: 1 — контроль, без дополнительных воздействий (группа К1), 2 — введение в зону повреждения культуральной среды без факторов роста (группа К2), 3 — введение суспензии (0,25 мл, $5 \cdot 10^5$ ММСК) (О1) клеток, культивированных в стандартных условиях, 4 — введение такого же количества ММСК, культивированных при 5 % кислорода (О2).

При гистоморфометрическом анализе групп О1 и О2 через 14 суток после операции выявлено достоверно большее значение коэффициента утолщения костной мозоли (КУ-КМ) в 1,2–1,3 раза по сравнению с группой К1 за счёт объёма хряща. Через 30 суток после операции в группах О1 и О2 значения КУ-КМ были в 0,17 и 0,24 раза меньше чем в группе К1 ($p < 0.05$). Сравнение костной мозоли на 14-е и 30-е сутки после перелома выявило значительное уменьшение КУ в группах О1 и О2 (на 50 % и 52 % соответственно). В группах К1 и К2 уменьшение КУ составило 24 % и 36 % соответственно.

Таким образом, продемонстрирована эффективность введения аллогенных ММСК костного мозга при регенерации перелома трубчатой кости.

*Работа выполнена при поддержке контракта № 02.522.11.2006/05
Роснауки*

Современный подход к тестированию клеточных препаратовЛобынцева Г.С.¹, Дзюблик И.В.², Трохименко Е.П.², Ворожка И.В.¹¹ *Институт клеточной терапии, Киев*² *Национальная медицинская академия последипломного образования, Киев*

Использование клеточных препаратов в медицине требует разработки протоколов, сочетающих в себе безопасность и эффективность применения.

Одним из методов, обеспечивающих безопасность, является тестирование образцов на присутствие инфекционных агентов. Для проведения исследования были взяты суспензии кроветворных клеток, выделенные из эмбриональной печени 6–12 недель гестации. Тестирование методом ПЦР на наличие возбудителей инфекционных заболеваний, которые отнесены к TORCH-инфекциям (гепатиты В и С, герпетические инфекции, токсоплазмоз, краснуха, сифилис, хламидиоз, уреаплазмоз, микоплазмоз) показало отрицательный результат. При морфологическом анализе препаратов была обнаружена токсическая зернистость в цитоплазме моноцитов, чрезмерная их вакуолизация и наличие клеток нейтрофильного ряда, что косвенно указывало на присутствие в тестированных образцах патогенов. Для выявления предполагаемых инфекционных агентов использовали методику изучения цитопатического действия (ЦПД) клеточных препаратов (8 образцов) на перевиваемые культуры клеток.

Были взяты культуры клеток с высокой чувствительностью к современным возбудителям: HEP-2, VERO, ПТП, L-929. Каждый материал тестировали в 5 повторностях. Проведено 3 пассажа с интервалом культивирования в одном пассаже 120 ч. Контроль состояния монослоя проводили с помощью инвертированного микроскопа и фотосъемки. Во всех исследуемых образцах через 12 часов культивирования было выявлено специфическое ЦПД, проявляющееся в разрушении монослоя культуры клеток, образовании симпластов и круглоклеточной дегенерации. Полученные данные свидетельствуют о наличии в опытных образцах патогенов, которые не входят в перечень возбудителей инфекционных заболеваний, определяемых нами методом ПЦР.

Данное исследование показало необходимость изучения ЦПД при тестировании клеточных препаратов для определения маркеров возбудителей. Накопление возбудителя в культуре даст возможность его идентифицировать, определить патогенность и изучить особенности антигенной структуры.

Активация стволового компартмента в печени крыс после частичной гепатэктомии и трансплантации клеток пуповинной крови человека

Газизов И.М., Андреева Д.И., Калигин М.С., Йылмаз Т.С.,
Гумерова А.А., Киясов А.П.

Казанский государственный медицинский университет

Целью нашего исследования было изучение экспрессии С-kit в печени крыс после частичной гепатэктомии с интраоперационным введением клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека.

Материалы и методы: исследование проводили на 30 белых беспородных крысах-самцах, которым произвели операцию частичной гепатэктомии по методике Хиггенса и Андерсона. Опытной группе животных (15 крыс) в ходе операции была произведена транслиенальная трансплантация мононуклеарной фракции пуповинной крови человека (1×10^6 клеток), полученной в градиенте плотности фиколла, контрольной группе — 1 мл. 0,9 % раствора NaCl. Забор органов производили через 2, 5, 7 сутки после операции, материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине и заливали в парафин по стандартной методике. Парафиновые срезы печени крыс окрашивали иммуногистохимически с моноклональными антителами к С-kit (маркер стволовых клеток).

Результаты: в срезах печени контрольной группы мы наблюдали экспрессию С-kit гепатоцитами и синусоидными клетками. В срезах печени животных опытной группы С-kit экспрессировался гепатоцитами и мелкими клетками с округлым ядром и узким ободком цитоплазмы, расположенных в портальных трактах и I зоне ацинуса, по фенотипу, напоминающих гепатобласты. Максимальное число С-kit-позитивных клеток в обеих группах наблюдалось через 2 суток после операции, на 5 и 7 сутки происходило постепенное снижение числа этих клеток. При этом, число С-kit-позитивных клеток в срезах печени опытной группы было выше, чем число С-kit-позитивных клеток на аналогичных сроках в срезах печени контрольной группы.

Выводы: трансплантация клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови после частичной гепатэктомии меняет характер активации стволового компартмента печени. Видимо, степень его активации снижается, так как при этом не происходит вовлечения в активацию стволового компартмента синусоидных клеток, выявляемой при классической частичной гепатэктомии.

Применение мягких контактных линз для создания тканеинженерной конструкции роговицы человека

Макеев О.Г.¹, Коротких С.А.², Князева Е.С.², Герасимов М.Ю.², Зверева А.С.¹

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава»

¹Отдел молекулярных медицинских технологий ЦНИЛ

²Кафедра глазных болезней

В рамках проекта по разработке технологии замещения повреждённой роговицы аутогенными культивированными кератоцитами и эпителиоцитами, проведено сравнительное исследование силикон-гидрогелевых контактных линз из материалов Comfilcon A (Biofinity®), Balafilcon A (Pure Vision®) и Senofilcon A (Acuvue® Oasys) с целью их применения в качестве подложки для культивирования клеток человеческой роговицы.

Использовали семидневные клеточные культуры, полученные из эксплантата лимба от здоровых добровольцев по протоколу, одобренному локальным этическим комитетом. На момент нанесения, культуры содержали кератоциты (85%) и эпителиоциты (15%). Суспензию клеток настилали на роговичную поверхность контактной линзы, культивировали в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки в течении 10 суток. В процессе культивирования оценивали адгезивные свойства линз, возможность создания плоскостных клеточных конструкций, соответствующих структуре роговицы.

При исследовании витальных препаратов оказалось, что первичный слой формируют фибробластоподобные кератоциты, с наибольшей эффективностью клонирования на линзах из материалов Comfilcon A и Balafilcon A. В первом случае колонии были упорядочены. На линзах из Senofilcon A отмечена фиксация отдельных клеток с отсутствием дальнейшего роста. Формирование монослоя кератоцитов на поверхности линзы завершалось к 7-8 суткам культивирования образованием на монослое колоний эпителиоцитов на линзах из материалов Comfilcon A и Balafilcon A. Наибольшая площадь колоний эпителиальных клеток наблюдалась на линзах из Balafilcon A.

Таким образом, линзы на основе Comfilcon A и Balafilcon A могут быть использованы в качестве клеточного носителя для аутотрансплантации кератоцитов на поверхности роговицы. Линзы на основе Balafilcon A применимы для создания многослойных эквивалентов роговицы с целью замещения её дефектов.

Аневризма левого желудочка человека как новый источник c-kit- позитивных клеток

*Дергилев К.В., **Гмызина А.И., **Рубина К.А., *Парфенова Е.В.,
*Цоколаева З.И., *Рахмат-Заде Т.М., *Акчурин Р.С., **Ткачук В.А.

*ФГУ «РКНПК Росмедтехнологий» Москва

**Московский государственный университет

им. М.В.Ломоносова, Факультет фундаментальной медицины, Москва

Трансплантация стволовых клеток является перспективным методом при лечении инфаркта миокарда. Для клеточной терапии используются различные источники клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, мезенхимальные, гематопоэтические клетки и скелетные миобласты. В последние годы появились свидетельства того, что сердце содержит пул стволовых и прогениторных клеток (c-kit+, sca-1+, isl-1+), которые обладают способностью *in vitro* и *in vivo* дифференцироваться в кардиомиогенном, эндотелиальном и гладкомышечном направлениях, а также предотвращают ремоделирование стенки левого желудочка и стимулируют улучшение функции сердца при введении в ишемизированный миокард. Стволовые клетки сердца могут быть выделены из кусочков биопсии миокарда человека и культивированы *in vitro*.

Целью данного исследования было охарактеризовать стволовые клетки сердца в ткани хронической аневризмы левого желудочка. Было проанализировано 15 образцов ткани аневризмы, полученных в ходе ее оперативного иссечения. Методом иммунофлуоресцентного окрашивания была исследована экспрессия маркеров стволовых клеток (c-kit, MDR1), гематопоэтических клеток (CD34, CD45), маркера пролиферации (Ki67), маркеров предшественников и зрелых кардиомиоцитов (Nkx 2.5, Gata-4, Mef2c, alpha-actinin), клеток эндотелия (Ets1, CD105, vW) и гладкомышечных клеток (Gata 6, SMA), а также была проанализирована экспрессия ингибитора клеточного цикла p21. Количество c-kit-позитивных клеток составляло около 3300 на см³ ткани. C-kit-клетки обнаруживались поодиночке в фиброзной, мышечной и жировой частях аневризмы, но преимущественно располагались в фиброзной ткани вблизи крупных сосудов. Ко-экспрессии c-kit и маркеров клеток эндотелия не наблюдалось. C-kit-позитивные клетки также обнаруживались в виде скоплений из 70-100 клеток, однако, экспрессии маркеров кардиомиогенной дифференцировки на них выявлено не было. C-kit-позитивные клетки не являлись клетками гематопоэтического ряда, поскольку не несли маркеров CD34 и CD45. Большинство c-kit-по-

зитивных клеток также экспрессировало MDR1, однако, c-kit-позитивные клетки не пролиферировали и не экспрессировали маркеров кардиомиоцитов, клеток эндотелия и гладкомышечных клеток. Около 20% c-kit-позитивных клеток экспрессировали ингибитор циклинзависимой киназы p21. C-kit-позитивные клетки могут быть выделены из ткани аневризмы с помощью иммуномагнитной селекции и могут быть культивированы в условиях *in vitro*.

Таким образом, ткань аневризмы левого желудочка человека является источником резидентных стволовых клеток сердца, регенеративный потенциал которых нуждается в дальнейшем изучении.

Методические трудности при культивировании клеток совместно с цеолитами

Голохваст К.С., Анисимова А.А., Паничев А.М.

Попытка получить дешевые и эффективные методики направленной дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток является одной из самых актуальных проблем современных клеточных технологий. Первым этапом в данном направлении является токсикологическая оценка перспективных индукторов направленной пролиферации. Существуют сообщения о возможности использования в качестве таких индукторов природных минералов (Кисилева Е. В. и др., 2007). Ранее нами были проведены исследования по влиянию природных минералов — цеолитов на культуру клеток HT 29 (рак кишечника человека) и JB6 Cl41 (нормальные клетки кожи мышей) (Голохваст К. С. и др., 2008).

Также нами предпринята попытка исследования токсического действия цеолитов, на культуру нейтральных стволовых клеток гиппокампа мыши. При этом установлено, что культивирование клеток *in vitro* вместе с цеолитами в дозировке 50 мг/мл, предложенной в статьях (Colic M., Pavelic K., 2000, 2002; Pavelic K. et al., 2001, 2002) сопряжено с рядом методических трудностей.

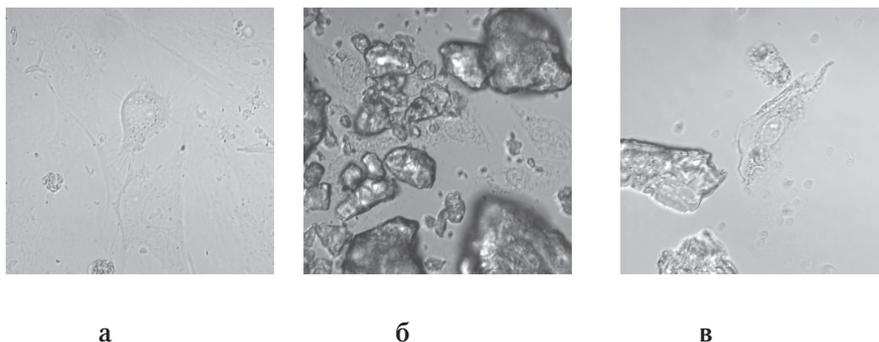


Рис. 1

- а) дифференцированные нейральные клетки, инкубация 48 часов, ув. x 1000
- б) нейральные клетки, инкубируемые совместно с цеолитом Вангинского месторождения, инкубация 48 часов, ув. x 1000
- в) нейральные клетки, инкубируемые совместно с цеолитом Лютогского месторождения, инкубация 48 часов, ув. x 1000

Во-первых, при культивировании в 6- и 24-луночных планшетах, цеолит в дозировке 50 мг/мл покрывает собой все клетки, прикрепленные к стеклу. В полях зрения клетки практически не видны. Недифференцированные плавающие клетки при пассажах просто вымываются. В итоге оценить токсическое действие или функциональное состояние клеток не представляется возможным. Кроме того, учитывая, что цеолит является водонерастворимым соединением возникает проблема с пипетированием — забиваются носики дозаторов. Третья проблема связана с тем, что при удалении цеолита из культуры происходит практически полная элиминация клеток из лунки — цеолит адсорбирует их на себя. Несмотря на возникшие трудности, некоторые выводы все же сделать можно. Цеолит Лютогского, Ванчинского, Куликовского, Чугуевского, Холинского, Шивертуйского и Вангинского месторождений не проявляет выраженных токсических свойств в дозировке 50 мг/мл, так как во всех экспериментальных группах были отмечены жизнеспособные клетки. К сожалению, статистически достоверных результатов, ввиду вышеуказанных методических сложностей, получить пока не удалось. В ряде случаев, нами были замечены клетки, которые в качестве субстрата для прикрепления использовали частицы цеолита (это хорошо просматривается на приведенных фотографиях см. рис. 1). Можно предположить, что элиминация клеток из лунки при удалении цеолита связана именно с этим наблюдением.

Индукция миогенной дифференцировки стромальных клеток основного вещества пупочного канатика

Горкун А.А.¹, Сабурин И.Н.¹, Кошелева Н.В.^{1,2}, Ревущин А.В.³,
Павлова Г.В.³, Репин В.С.¹

¹*НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН*

²*Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова*

³*Институт биологии гена*

Доступным и приемлемым с этической точки зрения источником аутологичных низкодифференцированных клеток является пупочный канатик. Стромальные клетки основного вещества пупочного канатика по ультраструктурным и биохимическими характеристикам сходны с миофибробластам (Kobayashi et al., 1998), они мультипотентны, и, как и мезенхимальные стромальные клетки костного мозга, могут быть использованы в клеточной терапии (Rachakatla et al., 2007). Целью нашей работы стало изучение индукции миогенной дифференцировки стромальных клеток пупочного канатика. Выделенные нами стромальные клетки пупочного канатика экспрессировали CD44, CD90, виментин, фибронектин, коллагены I и IV типов, скелетный миозин, не экспрессировали CD34 и CD45. Для изучения их способности дифференцироваться в миогенном направлении использовали: 1) культивирование в кондиционированной миобластами среде, 2) химическую индукцию, 3) сокультивирование с миобластами. В кондиционированной миобластами среде к пятому дню в культуре стромальных клеток пуповины формировались дикарионы, в отдельных клетках была выявлена экспрессия саркомерного В-актинина. При химической индукции в культуре стромальных клеток пуповины через 7–10 дней формировались симпласты, что согласуется с данными других исследователей (Conconi et al., 2006). При сокультивировании (1:1) окрашенных DiO стромальных клеток пуповины с миобластами, окрашенными DiI, уже к 4–5 суткам наблюдали слияние стромальных клеток пуповины, как между собой, так и с миобластами с формированием симпластов и структур, по морфологии напоминающих миотубы. Полученные результаты расширяют представления о дифференцировочном потенциале стромальных клеток основного вещества пупочного канатика, что подтверждается индукцией миогенной дифференцировки в наших экспериментах под действием химических агентов, секретлируемых миобластами факторов, а также через слияние с миобластами.

Особенности фибробластов постожогового рубца

Григорьева О.А., Сысоева В.Ю., Рубина К.А.

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Факультет фундаментальной медицины, Москва*

Фибробласты дермы являются ключевыми участниками процесса заживления раны, при этом фибробласты пролиферируют и выделяют факторы, ускоряющие процессы заживления. Известно, что при термических поражениях больших площадей срок регенерации кожи может значительно увеличиваться, а ожоги третьей и четвертой степени часто сопровождаются образованием гипертрофического шрама. Предположительно, изменение динамики заживления раны в этих случаях связано с системными нарушениями баланса факторов роста, хемокинов и цитокинов в организме и, соответственно, с изменением свойств фибробластов, участвующих в регенерации кожи и формировании рубца. В связи с этой актуальной задачей является исследование механизмов, препятствующих нормальному заживлению ожоговых ран при ожогах большой площади. С целью выявления молекулярных механизмов заживления постожоговых ран было проведено сравнительное исследование уровня факторов роста и цитокинов в крови ожоговых больных и здоровых доноров, а также сопоставление этих данных с результатами цитологических и гистологических исследований.

В результате работы было показано, что на поздних сроках формирования рубца (7, 9 и 11 месяцев после повреждения) в биоптатах рубцовой ткани наблюдается активная пролиферация клеток (7 месяцев), которая к 11 месяцу падает. При этом при изучении апоптоза наблюдается обратная зависимость: процент апоптотических клеток к 11 месяцу возрастает. Пролиферирующие клетки (Ki67 позитивные) наблюдаются как в составе сосудов, так и в базальном слое кератиноцитов. Единичные пролиферирующие клетки, находящиеся в ткани, вероятно, являлись фибробластами. Однако оказалось, что в отличие от фибробластов нормальной кожи, фибробласты из ожоговой ткани и прилежащей к ней здоровой кожи, выделяемые и культивируемые по стандартной методике, не пролиферируют *in vitro*. При анализе содержания факторов роста (VEGF, bFGF, HGF и ангиопоэтин-1) в сыворотке крови пациентов с ожогами больших поверхностей установлено, что уровень этих факторов достоверно выше, чем у здоровых доноров.

Полученные данные свидетельствуют о том, что фибробласты кожи ожоговых больных не пролиферируют *in vitro*, а в крови у таких пациентов

уровень факторов роста выше, чем в норме. Эти данные позволяют предположить, что у таких больных происходят системные изменения в организме, которые влияют на свойства фибробластов как в зоне повреждения, так и в прилежащей коже, что может затруднять культивирование фибробластов *in vitro*.

Спонтанное изменение фенотипа и кариотипа мезенхимных стволовых клеток человека в культуре

Григорян А.С.¹, Кругляков П.В.¹, Таминкина Ю.А.¹, Пендина А.А.²,
Полынцев Д.Г.¹

¹ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург

²ГУ НИИ Акушерства и Гинекологии им. Д.О. Отта РАМН,
Санкт-Петербург

Сегодня трансплантация мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из костного мозга человека, считается перспективным терапевтическим подходом к лечению ряда заболеваний. Тем не менее, до сих пор остается актуальным вопрос о возможности спонтанного изменения свойств данных клеток при их культивировании *in vitro* и даже о приобретении ими туморогенного потенциала. В нашей работе было обнаружено, что даже при непродолжительном культивировании в общепринятых стандартных условиях единичные культуры МСК человека подвержены изменению характеристик. Этот феномен встречается примерно в одной из двухсот культур МСК, полученных из костного мозга здоровых доноров. На втором-третьем пассажах морфология клеток меняется: они резко увеличиваются в размерах, становятся более отростчатыми, в ядрах четко выявляется одно-два крупных ядрышка. Часть клеток, напротив, округляется, открепляется от культурального пластика и переходит в суспензию, где продолжает активно делиться. Анализ иммунофенотипа клеточной популяции показывает, что с каждым пассажем снижается экспрессия клетками основного маркера МСК – CD90. На первых пассажах доля клеток, экспрессирующих CD90, составляет от 98 до 100%, на четвертом-шестом – около 80%, к десятому пересеву культуры в ней остается не более 10-15% клеток, экспрессирующих CD90. При анализе кариотипа данных клеток было обнаружено, что от 5 до 23% клеток в культуре несут множественные хромосомные абберации: как числовые (полиплоидии, наличие дополнительных маркерных хромосом), так и структурные (транслокации, делеции и инсерции). Пов-

торияемости геномных перестроек не выявлено, что говорит о том, что каждая перестройка происходит в отдельной клетке. К настоящему времени не выяснен вопрос о том, являются ли такие клетки опухоленными, однако мы считаем, что данные случаи должны привлечь более пристальное внимание исследователей на проблему контроля свойств мезенхимных стволовых клеток в культурах для исключения негативных побочных эффектов их обратного введения в организм человека в терапевтических целях.

Влияние культивирования в бессывороточной среде на морфофункциональные свойства лМСК

Гринаковская О.С., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

*Учреждение Российской академии наук
Государственный научный центр Российской Федерации —
Институт медико-биологических проблем РАН*

Мезенхимальные стромальные клетки-предшественники из липоаспирата (лМСК), представляют собой малодифференцированные клетки с высокой пролиферативной активностью, которые при аллогенном введении в организм не провоцируют иммунный ответ. Однако, для предварительной экспансии лМСК *in vitro* используют эмбриональную сыворотку коров (FBS), компоненты которой при попадании в организм могут вызывать развитие иммунной реакции. Альтернативой использованию FBS в настоящее время является применение бессывороточных сред. Целью настоящего исследования было изучение морфофункциональных свойств лМСК при культивировании в бессывороточной среде MSCBM (Lonza, USA).

лМСК культивировали в стандартной среде (DMEM) с 10 % FBS и в среде MSCBM в течение 3 пассажей, рассчитывали количество клеточных удвоений (КУ), фенотипировали и определяли жизнеспособность. Состояние лизосом и митохондрий оценивали, окрашивая клетки лизо- и митотрекерами, соответственно.

Показано, что при культивировании в среде MSCBM лМСК были более крупными и распластанными, с выраженной зернистостью в перинуклеарной области. Между лМСК, культивируемыми в DMEM+10 % FBS и в среде MSCBM не обнаружено различий в количестве КУ, жизнеспособности ($93 \pm 3 \%$) и иммунофенотипом. При культивировании лМСК в DMEM+10 % FBS, был выше трансмембранный потенциал митохондрий, чем в Lonza. Более интенсивное окрашивание лМСК лизотрекером

в Lonza указывало на закисление лизосомального компартмента клетки, что свидетельствовало об активации лизосом.

Таким образом, обнаружено, что при использовании среды MSCBM ухудшается морфофункциональное состояние ЛМСК, что диктует необходимость дальнейших поисков альтернативы культивирования клеток с сывороткой.

Работа выполнена при финансовой поддержке контракта № 02.522.11.2006 Роснауки.

Инактивация X-хромосомы в линиях эмбриональных стволовых клеток человека

Зайцева Н.С.

Институт цитологии и генетики СО РАН, Центр клинической экспериментальной медицины СО РАМН

Основное свойство эмбриональных стволовых клеток — плюрипотентность, поддерживается за счет экспрессии определенных генов, предотвращающих дифференцировку. В мышинных стволовых клетках с кариотипом XX, одним из показателей плюрипотентности, а следовательно недифференцированного состояния, является наличие двух активных X-хромосом, тогда как для эмбриональных стволовых клеток человека данные противоречивы.

В работе использованы три линии ЭСК человека, с кариотипом XX (HUES9, ESM01, ESM04). Проведено исследование экспрессии основных генов, ответственных за плюрипотентное состояние клеток, направления дифференцировки исследуемых клеточных линий и статус X-хромосом.

Показано, что все три линии клеток являются плюрипотентными и обнаруживают высокий уровень экспрессии генов *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *DNMT3B*, *TDGF1*. Отмечено, что экспрессия гена *GDF3* снижена в линии ESM04.

Экспрессия гена *XIST*, ключевого для процесса инактивации X-хромосомы, обнаружена в линиях ESM01 ESM04, тогда как в линии HUES9 ген *XIST* не экспрессируется. Для уточнения статуса X-хромосом в клеточных линиях проведено исследование модификаций хроматина: H3K4me2, являющейся маркером транскрипционно активного хроматина, а также H3K27me3 и белка HP1 — маркеров транскрипционно неактивного хроматина. Показано, что в линии ESM04 выявляется неактивная X-хромо-

сома, на которой отсутствует гистоновая модификация H3K4me2. В линиях ESM01 и HUES9 данная модификация обнаружена на всех хромосомах, что свидетельствует об отсутствии неактивной X-хромосомы. В линии ESM04, на одной из двух X-хромосом выявлено не только отсутствие H3K4me2, но и обогащение H3K27me3 и HP1. Таким образом, исследованные линии отличаются статусом X-хромосом и могут находиться на разных стадиях процесса инактивации. Очевидно, что наличие инактивированной X-хромосомы в ЭСК человека не связано с их плюрипотентным состоянием и носит линиеспецифичный характер.

Разработка технологии лечения нейротрофических язв при сахарном диабете

Макеев О.Г., Улыбин А.И., Зубанов П.С., Зверева А.С., Васильева М.С.
ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Росздрава». Отдел молекулярных медицинских технологий ЦНИЛ. Кафедра биологии

В процессе проведения клинического этапа испытаний по применению аутогенных фибробластов для закрытия язвенных дефектов у 9 больных сахарным диабетом второго типа проанализирована полугодовая эффективность применения клеточной терапии.

Отбор пациентов проводился на основании анамнестических данных, результатов врачебного осмотра, лабораторных исследований и добровольного информированного согласия испытуемого. Критерием включения в испытание являлось наличие язвенного дефекта в течение не менее 6 месяцев, безуспешность консервативного лечения и площадь язвы не менее 35x10 мм (на стопе) и 65x50 мм (на голени).

Технология включала в себя взятие эксплантата кожи, культивирование полученных клеток в среде ДМЕМ с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки и факторов роста. Суспензию, содержащую до 5 млн. клеток однократно наносили на область язвенного дефекта и фиксировали аутологичной фибриновой пленкой. Трансплантация фибробластов проводилась после санации раны (количество микробных тел не более 150 на см²).

Средняя продолжительность лечения (с момента трансплантации аутофибробластов до эпителизации) при локализации язв на стопе составила 8,47 недели, при локализации на голени — 19,3 недели.

У 33% испытуемых сокращение язвенного дефекта в течение первой недели составило до половины язвенной поверхности, у 33% - не менее

трети. В 33% достигалось незначительное сокращение. На 20 неделе в 88% случаев отмечалась полная эпителизация язв. У одного испытуемого выявлен рецидив язвы, обусловленный нарушением методики использования разгрузочной повязки.

Предварительные результаты свидетельствуют о том, что применение культивируемых фибробластов для закрытия язвенных дефектов кожи в аутогенном варианте у больных сахарным диабетом является безопасным и эффективным. Применение технологии обеспечивает полную эпителизацию язв в период от 9 (при локализации на стопе) до 20 недель (при локализации на голени).

Регуляция активности стромальных и провоспалительных клеток под действием альфа-фетопротейна

Зубкова Е.С.¹, Меньшиков М.Ю.¹, Семенкова Л.Н.², Дудич Е.И.²,
Парфенова Е.В.¹

¹*ФГУ НИИЭК РК НПК Росмедтехнологий*

²*ОАО "Институт Инженерной Иммунологии"*

Ведущиеся в настоящее время исследования возможности повышения эффективности клеточной терапии связаны с поиском биологически активных агентов, усиливающих жизнеспособность клеток после их трансплантации в поврежденную ткань. Особое внимание привлекают к себе белковые и пептидные молекулы, вовлеченные в процессы эмбрионального развития. В этой связи выглядит перспективным использование альфа-фетопротейна (АФП), основного белка сыворотки, выявляемого на ранних стадиях эмбриогенеза и при развитии раковых опухолей. АФП имеет в своем составе ряд регуляторных эпитопов, определяющих его участие в регуляции иммунитета, клеточной пролиферации, опухолевой активности и ряде других процессов. Проведенное нами исследование показало, что рецептор АФП выявляется в стромальных клетках жировой ткани человека (СКЖТ), однако он представлен в значительно большем количестве на моноцитарных клетках линии ТНР-1. АФП усиливает пролиферацию СКЖТ, а также их адгезию на фибронектин, уменьшает апоптоз, однако, не оказывает существенного воздействия на их миграцию. Оценивая воздействие АФП на активность воспалительных клеток, мы обнаружили, что он стимулирует инвазию моноцитов ТНР-1 в матрикеле, а также образование этими клетками матриксной металлопротеиназы-9 (ММП9), опосреду-

емое активацией MAP-киназных каскадов ERK1,2, p38, JNK и активацией фактора транскрипции NFBB. Эти эффекты АФП подавляются препаратом Maraviroc, ингибитором С-С рецептора CCR5, опосредующего клеточные эффекты хемокинов RANTES, MIP-1B и MIP-1B. Нами также получены данные о возможности участия интегринов в сигнальном пути, запускаемом АФП. Таким образом, проведенное исследование показало, что АФП способен оказывать существенное воздействие на инвазивную и секреторную активность моноцитарных клеток. Выраженность этих эффектов, по-видимому, существенным образом определяется плотностью клеточных рецепторов CCR5, и, вероятно, не зависит от активации классического рецептора АФП.

Оптическое трехмерное позиционирование и модификация биологических объектов на клеточном и субклеточном уровне

Ракитянский М.М.^{1,2,3}, Карагяур М.Н.¹, Агранат М.Б.², Мухамеджанова Д.М.⁴,
Ашитков С.И.², Домогатский С.П.⁵, Овчинников А.В.², Ситников Д.С.²,
Стамбольский Д.В.¹, Шевелев И.Н.³

¹ МГУ, факультет фундаментальной медицины (ФФМ МГУ)

² Объединенный институт высоких температур РАН (ОИВТ РАН), Москва

³ НИИ нейрохирургии им. Бурденко РАМН, Москва

⁴ Московский государственный медико-стоматологический университет

⁵ Российский кардиологический научно-производственный комплекс
МЗ РФ, Москва

Новые возможности, ассоциированные с развитием технологий оптического пинцета и скальпеля, ведут к решению комплексных медико-биологических и медицинских проблем. К таковым относится создание функциональных эквивалентов разных биологических тканей. Для работ в этом направлении в ОИВТ РАН в сотрудничестве с ФФМ МГУ создан комплекс фемтосекундного лазерного пинцета и скальпеля на основе приборной базы, производимой в России. Эта система позволяет прецизионно манипулировать и позиционировать в трехмерном пространстве одиночными или несколькими биологическими объектами микронного и субмикронного размеров. Проводятся работы по оптимизации процесса манипулирования с точки зрения надежности, скорости и безопасности для живых клеток. Особое внимание уделяется оптическому манипулированию структурно-функциональными элементами нервной ткани млекопитающих, а именно глиальными клетками, телами и волокнами нейронов. Возможности этой

системы не ограничены типом клеток, и она может быть использована для исследования межклеточных взаимоотношений стволовых клеток и их микроокружения.

Стратегически важным является развитие методов собственно клеточной хирургии, позволяющих производить прецизионную оптическую модификацию биообъектов на клеточном и субклеточном уровне: прецизионное выключение избранных структур клетки, перфорации мембран клеток с целью трансфекции и введения в клетку наноразмерных частиц, суперселективная агрегация и слияние клеток, диссекция структур клеток. Комбинированное использование оптического скальпеля и пинцета является мостом, соединяющим ультрамикро-наноскопический мир с микро и макроскопическим миром уже разработанных медицинских технологий, и их полные возможности еще предстоит установить.

Экспериментальное обоснование применения аутологичных стволовых клеток костного мозга для лечения костных дефектов и генерализованного пародонтита

Кауламбаева М.Р.

Научно-производственное предприятие «Антиген», г. Алматы

Целью данной работы было обосновать остеорепаративную эффективность применения культур аутологичных стволовых клеток костного мозга при экспериментально воспроизведенных стандартных дефектах костной ткани челюстных костей морских свинок и генерализованного пародонтита, смоделированном на нижней челюсти кроликов.

Применение традиционного метода восстановления костного дефекта под кровяным сгустком имело незначительную эффективность. Площадь костного дефекта в течение 40 суток наблюдения уменьшилась с $19,2 \pm 0,3$ мм² до $10,3 \pm 0,4$ мм². Эффективность репарации костной ткани составила 46,3 %. Во второй подгруппе: инъекции предкультивированных аутологических клеток костного мозга в сочетании с костным коллагеном в область костного дефекта оказались наиболее эффективными в остеорепарации. Площадь дефекта через 20 суток уменьшилась до $7,7 \pm 0,5$ мм², а через 40 суток до $1,2 \pm 0,2$ мм². Прирост костной ткани составил около 93,6 % от общей площади дефекта.

Существенная разница наблюдалась между применением традиционного метода (контрольная группа) лечения генерализованного пародонтита

и клеточных технологий в сочетании с костным коллагеном. На 40 сутки эксперимента прирост костной ткани и уменьшение глубины пародонтального кармана в контрольной группе составил 38,77 %, а в испытуемой группе 78,57 %, что более чем в 2 раза больше, чем в контроле.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что применением аутологических мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для лечения костных дефектов и генерализованного пародонтита является более эффективным по сравнению с традиционными методами.

Результаты данного эксперимента открывают широкие возможности применения клеточных технологий в ветеринарии и медицине

Сравнительный анализ антигенного профиля мезенхимных стромальных клеток из миелоидных органов крыс на разных этапах культивирования *in vitro*

Кожевникова М. Н., Шевелева О. Н., Старостин В. И.

*Учреждение Российской академии наук
Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова*

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) рассматриваются как мультипотентные тканеспецифические стволовые и родоначальные клетки взрослого организма, способные осуществлять направленную дифференцировку в различные клетки соединительной ткани. Сравнительный анализ экспрессии позитивных и негативных маркеров МСК из зрелого костного мозга (КМ) и печени зародышей (ПЗ) на разных сроках их культивирования проведен с использованием методов иммуноцитохимии, проточной цитофлуориметрии и ПЦР-анализа. Иммунофлуоресцентный анализ первичных культур из КМ и ПЗ выявил примесь CD45⁺ и CD34⁺ клеток. С помощью ПЦР-анализа во всех исследованных культурах МСК на 1–2 пассаже детектирована мРНК генов *CD45*, *CD11b* и *CD144*. Все это указывает на присутствие в составе изучаемых популяций макрофагов, лимфоцитов и эндотелиальных клеток на ранних этапах культивирования. Однако, начиная с 3-го пассажа, обе популяции МСК освобождаются от примесей кровяных и эндотелиальных клеток. Кроме того, в обеих культурах на 1-ом и последующих пассажах не обнаружена мРНК гена маркера В-лимфоцитов *CD19*. На 1–3 пассажах практически все МСК из КМ экспрессировали маркеры CD90 и CD73. По предварительным данным цитофлуори-

метрического анализа CD90 выявлен в 89.1 и 92.1 % клеток популяции из ПЗ, тогда как CD73 — лишь в 59.5 и 68.3 % этих клеток. На 8–11-ом пассажах подавляющее число МСК из КМ и ПЗ экспрессировали CD90, что согласуется с данными ПЦР-анализа, тогда как экспрессия CD73 в обеих культурах МСК названных пассажей сохранялась лишь в отдельных клетках — 8.2 % в культуре МСК из КМ и 3.8 % в культуре МСК из ПЗ по данным цитофлуориметрии. При долгосрочном культивировании МСК из КМ и ПЗ также наблюдалось заметное снижение содержания мРНК гена *CD73*. Нами выявлено снижение уровня экспрессии еще одного гена — *CD105* в обеих клеточных популяциях МСК. Цитофлуориметрический анализ различных субпопуляций МСК будет продолжен.

Получение и идентификация постоянных линий эмбриональных стволовых клеток человека

Кольцова А.М., Крылова Т.А., Яковлева Т.К., Мусорина А.С., Полянская Г.Г.

Институт цитологии РАН

Эмбриональные стволовые клетки человека, выделенные из эмбрионов не позднее стадии бластоцисты, представляют собой уникальный клеточный материал, обладающий такими свойствами как неограниченная пролиферация и способность дифференцироваться в производные трех зародышевых листков и в линию половых клеток. Эти свойства делают их перспективным объектом для фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований.

Несмотря на уникальность каждой линии ЭСК, что определяется её геномом, все они должны отвечать определенному набору характеристик, подтверждающих их статус. В настоящей работе представлены результаты по получению двух постоянных линий ЭСК и подтверждению их статуса как ЭСК человека. Выделение внутриклеточной массы из предимплантационных бластоцист проводили механическим методом. Последующее культивирование выделенных ЭСК проводили на слое фидерных клеток (митотически инактивированные эмбриональные мезенхимные фибробласты человека). Пересев ЭСК проводили механическим способом путем нарезания колоний на отдельные кластеры.

Обе линии ЭСК прошли более 120 удвоений клеточной популяции. Среднее время одного удвоения клеточной популяции для этих линий составило 28.2 ± 0.64 и 21 ± 0.64 соответственно. Обе линии имеют нормаль-

ный кариотип человека 46, XX.

С помощью гистохимического анализа показана высокая активность щелочной фосфатазы. Иммунофлуоресцентный анализ выявил экспрессию транскрипционных факторов Oct-4 и Nanog, поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1—60, а также экспрессию маркеров, характерных для производных эктодермы, мезодермы и энтодермы в условиях *in vitro*.

В обеих линиях выявлена экспрессия Р-гликопротеина, АТФ-связывающего ABCG2 транспортера, являющегося, по-видимому, одним из механизмов защиты ЭСК от повреждений, вызываемых проникновением в клетку активных агентов.

Эффект фракционирования дозы облучения ослаблен у стволовых клеточных линий мышей, радиорезистентность которых повышена путем предварительного введения животным канцерогена 1,2-диметилгидразина

Конопляников А.Г., Конопляникова О.А., Проскуряков С.Я.,
Кальсина С.Ш., Агаева Е.В., Носаченко В.В.

Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

В опытах на мышах линии СВА методом фракционирования дозы облучения изучали в сравнительном плане способность к восстановлению сублетальных радиационных повреждений в КОЕ-С-8 у интактных мышей и у животных, которым за сутки до облучения инъецировали канцероген — 1,2-диметилгидразин. Были подтверждены ранее полученные нами данные о том, что введение мышам канцерогена за 1 сутки до гамма-облучения в дозе 7 Гр приводит к повышению радиорезистентности КОЕ-С-8, тестируемую методом селезеночных эндоколоний. При фракционированном облучении мышей в той же суммарной дозе (последовательно 4 и 3 Гр, разделенные временным интервалом в 4 ч) у мышей, не получавших канцероген наблюдается значительное повышение выхода селезеночных эндоколоний, а у животных с введением канцерогена такой эффект выражен значительно слабее. Можно предположить, что введение данного канцерогена, вероятный эффект которого связывается с повреждением активности гена *p53* и торможением апоптоза в облученных клетках с нарушениями генетического материала, приводящем к повышению их радиорезистентности, одновременно нарушает механизм репарации сублетальных радиационных повреждений.

Использованную нами экспериментальную модель можно рассматривать как способ изучения свойств предшественников, так называемых, раковых стволовых клеток (РСК), материалы по характеристике которых достаточно скудны. Ранее было установлено, что РСК обладают повышенной резистентностью к химио- и лучевой терапии. Данные этого исследования свидетельствуют о возможном нарушении протекания в РСК репаративных процессов после нанесения радиационных повреждений, что может быть использовано при разработке новых схем лучевой терапии радиорезистентных форм злокачественных опухолей.

Экспериментальное обоснование и клинический опыт клеточной терапии методом системной трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток при язвенном колите и болезни Крона

Конопляников А.Г., Князев О.В., Лазебник Л.Б., Цыб А.Ф.

*Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск
Центральный НИИ гастроэнтерологии, Москва*

Известно, что уникальные иммунологические свойства мезенхимальных стволовых клеток (МСК), связанные с их способностью ослаблять иммунные конфликты в организме, побуждают рассматривать их как один из наиболее перспективных агентов при лечении различных аутоиммунных заболеваний (Le Blanc K., Ringden O., 2005). В настоящее время в ряде зарубежных стран и в России начались клинические исследования по использованию МСК при лечении больных язвенным колитом и болезнью Крона, так как существующие методы терапии пока остаются мало эффективными. В коллективной работе двух наших институтов вначале были проведены предклинические исследования по оценке терапевтического эффекта внутривенной (системной) трансплантации МСК на модели острого и хронического колита, вызванного у крыс линии Вистар добавлением в питьевую воду декстран-сульфата. Было показано, что введение подопытным крысам с индуцированным острым и хроническим колитом размноженных в культуре костномозговых МСК в дозе 5млн клеток/кг массы тела обладает выраженным лечебным действием. Основываясь на полученных данных, а также на данных литературных, был разработан клинический протокол терапии больных язвенным колитом и болезнью Крона путем системной трансплантацией аллогенных костномозговых МСК, который сходен с раз-

решенным FDA в США протоколом 2–3 стадий клинических испытаний. В проводившемся нами исследовании применяли культуры МСК, выращенные согласно лицензии Росздравнадзора МЗиСР РФ ФС-2006/206. У всех 30 пациентов наблюдали резкое ослабление воспалительного процесса, нормализацию иммунного статуса, что позволило отменить у большинства использование кортикостероидов. У наблюдаемых более года пациентов не было выявлено каких-либо побочных и нежелательных эффектов трансплантации МСК.

Лечебный эффект мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и кондиционной среды из под культур МСК при радиационных и радиационно-термических повреждениях

Конопляников А.Г., Проскуряков С.Я., Петров В.Н.,
Коноплянникова О.А., Ульянова Л.И., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш.,
Семенкова И.В., Агаева Е.В., Носаченко В.В.

Медицинский радиологический научный центр РАМН, Обнинск

В опытах на лабораторных животных (мыши и крысы различных линий) было изучено терапевтическое действие аутологичных, аллогенных и ксеногенных МСК и кондиционной среды из под культур МСК при различных формах лучевого и радиационно-термического поражения. Внутрибрюшинное введение лабораторным животным МСК или кондиционной среды незадолго до общего гамма-облучения или сразу после него ослабляло летальный эффект и поражение региональных стволовых клеток, тестируемые при «костномозговой» и «кишечной» формах лучевого поражения. Подобное терапевтическое действие введения МСК или кондиционной среды регистрировали также в случае нанесения мышам комбинированной термо-лучевой травмы. Так как практически не было выявлено существенных видовых различий при введении облученным животным клеток и кондиционной среды аутологичного, аллогенного и ксеногенного происхождения, то можно предположить, что наблюдаемый эффект в основном определяется за счет паракринного действия агентов, продуцируемых в процессе роста культур МСК. Идентификация и выделение этих агентов и создание на этой основе новых радиозащитных и лечебных препаратов поэтому становится одной из актуальных задач радиационной биологии и регенеративной медицины.

Влияние различных методов трансплантации мезенхимных стволовых клеток костного мозга на посттравматические процессы в головном мозге крыс

Григорян А.С.¹, Гилерович Е.Г.², Павличенко Н.Н.¹, Кругляков П.В.¹,
Соколова И.Б.¹, Польшцев Д.Г.¹

¹ ООО «Транс-Технологии», Санкт-Петербург

² ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Изучение морфологических изменений в головном мозге после механического повреждения — необходимый этап исследования возможностей клеточной терапии в коррекции последствий черепно-мозговой травмы. Эксперименты проведены на крысах инбредной линии Вистар-Киото. Мезенхимные стволовые клетки (МСК) были выделены из костного мозга животных, культивированы и окрашены флуоресцентным красителем РКН26 *in vitro*. Травма была нанесена в левое полушарие головного мозга. МСК трансплантировали на 3 сут после операции непосредственно в нервную ткань, окружающую травматическую полость (группа 1), в хвостовую вену (группа 2), и сочетанно (группа 3). Животным из групп контроля не проводили терапии, либо вместо МСК инъецировали чистую культуральную среду МЕМ- α . Образцы нервной ткани отбирали через 7 сут после нанесения травмы. Анализ распределения МСК в мозге показал, что при внутривенной трансплантации меченые клетки располагаются непосредственно в области травмы, при инъекции в паренхиму мозга они обнаруживаются также в желудочковой системе. По результатам гистологического анализа можно заключить, что наибольшее повреждение нервной ткани, характеризующееся массовой гибелью нейронов и глиозом, обнаруживается в группе 1, меньшее — в группе 3, и наименьшее из всех групп — в группе 2. В группах 2 и 3 патологический процесс выражен сильнее, чем в группах контроля, при этом в мозге наблюдаются несвойственные ему образования, состоящие в том числе из трансплантированных клеток, вызывающих локальный фиброз. Судя по клеточному составу инфильтрата, образующегося в травматической полости и прилежащих к ней участках, МСК ускоряют процесс посттравматического асептического воспаления. Предварительно можно заключить, что трансплантация МСК при травме головного мозга — перспективный метод клеточной терапии, однако положительный эффект оказывает только внутривенная трансплантация.

Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток в терапии сахарного диабета I типа у крыс

Вийде С. К., Соколова И. Б., Кругляков П. В., Полынцев Д. Г.

ООО “Транс – Технологии” Санкт - Петербург

По числу заболевших сахарный диабет занимает одно из ведущих мест в экономически развитых странах. К настоящему моменту эффективность применяемых методов лечения недостаточна: полного выздоровления добиться не удастся. А между тем количество пациентов с каждым годом увеличивается, и заболевают все более молодые люди

Цель исследования: проверить, можно ли с помощью внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) скорректировать состояния диабетических животных и предотвратить развития осложнений.

Эксперименты проводятся на крысах – самцах линии Вистар – Киото. МСК были выделены из костного мозга животных. Фенотипирование МСК проводили методом проточной цитофлуориметрии.

Сахарный диабет был смоделирован посредством интраперитонеальных инъекций стрептозотоцина (2 укола через 3 сут по 30 мг/кг). Животным из группы клеточной терапии через 7 сут после 1 укола внутривенно было введено 5 млн МСК в 100 мкл культуральной среды. Длительность эксперимента – 155 сут.

Результаты. Через 155 сут в группе клеточной терапии количество животных было в 1,6 раза больше, чем в контроле. При этом у всех животных сохранялся высокий уровень глюкозы в крови.

На гистологических препаратах поджелудочной железы при окраске по методу Гейденгайна было показано, что введение МСК предотвращает развитие фиброза островков Лангерганса.

Через 155 сут у животных контрольной группы были выявлены абсцессы в ткани почек (42,8 %), печени (28,6 %), легких (14,3 %), тогда как в группе клеточной терапии только у 10 % животных отметили морфологические изменения в ткани почки.

Итак, однократным внутривенным введением МСК крысам, больным сахарным диабетом I типа, не удалось скорректировать уровень глюкозы в крови животных и предотвратить развитие гипергликемии. Однако, клеточная терапия позволила увеличить продолжительность жизни и практически полностью предотвратить развитие диабетических осложнений.

Влияние внутривенной трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на посттравматические процессы в головном мозге крысы

Соколова И. Б., Федотова О. Р., Гилерович Е. Г., Павличенко Н. Н.,
Кругляков П. В., Полынцев Д. Г.

ООО “Транс – Технологии” Санкт - Петербург

Эффективность применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) при инсультах и травмах головного мозга показана во многих экспериментальных работах. Цель данного исследования — выяснить, какие морфологические изменения в ткани головного мозга после клеточной терапии приводят к восстановлению поведения животных с минимальной травмой (1 мм³) первичной двигательной коры.

Эксперименты проведены на нелинейных половозрелых крысах — самках (n=100) массой 250 — 300 г. МСК были выделены из костного мозга животных и перед трансплантацией помечены флуоресцентным красителем РКН 26. Фенотипирование МСК проводили методом проточной цитофлуориметрии. Поведение животных в тесте «Открытое поле» изучали за несколько дней до нанесения мозговой травмы и через 2, 4 нед. Этаназия животных была проведена через 1, 2 и 4 нед после травмы. Сегмент мозга с зоной повреждения от 8 животных фиксировали в формалине, от 3 — криофиксировали. Проведено иммуногистохимическое окрашивание препаратов на PCNA, NeuN, vWF.

Через 4 нед после травмирования контрольные животные двигались примерно в 2 р меньше, чем интактные, тогда после введения МСК крысы полностью восстановили свое поведение.

После внутривенной трансплантации меченые МСК находились непосредственно в мозговой ткани, граничащей с дефектом. В самом месте тканевого повреждения быстрее протекали процессы воспаления и образования рубцовой ткани. В пограничной области количество микрососудов и жизнеспособных нейронов было больше, чем в контроле в 1.6 и 1.7 раза соответственно. Следовательно, внутривенная трансплантация МСК привела к уменьшению площади вторичной дегенерации нервной ткани в неокортексе. Через 2 нед после травмы в области проводящих путей глубокой части хвостатого ядра у животных контрольной группы были обнаружены пролиферирующие клетки, а в группе клеточной терапии нет. Через 1 нед после травмы были выявлены только единичные пролиферирующие клетки в хвостатом ядре в обеих группах. Мы можем предположить, что пролиферирующие клетки — это астроциты (но иммуногистохимически это не

доказано). Проллиферация астроцитов свидетельствует о гибели аксонов. Если наше предположение верно, то отсутствие пролиферирующих клеток в проводящих путях говорит о сохранении их целостности.

Итак, внутривенная трансплантация МСК способствует сохранению микроциркуляции и жизнеспособности нейронов в пограничной с повреждением зоне, уменьшению объема ткани мозга, затронутой процессами вторичной дегенерации, что позволяет минимизировать количество дегенерирующих волокон в экстрапирамидных проводящих путях, тем самым сохраняет моторику животных.

Улучшение васкуляризации мышечной ткани после ауто трансплантации стволовых клеток периферической крови больным облитерирующим эндартериитом

Мавликеев М., Табанакова А., Трондин А., Певнев Г.,
Бурганова Г., Киясов А.

Казанский государственный медицинский университет

Облитерирующий эндартериит (ОЭ) — хроническое заболевание сосудов нижних конечностей, характеризующееся прогрессирующей ишемией тканей и приводящее к инвалидизации больных. Традиционные методы лечения обеспечивают лишь временное улучшение течения болезни, что диктует необходимость поиска новых методов лечения ОЭ. Одним из них может стать клеточная терапия стволовыми клетками (СК), эффективность которой показана в доклинических исследованиях. Нами проведены клинические исследования в рамках программы «Развитие клеточной медицины в Республике Татарстан». Целью нашей работы стало изучение влияния трансплатации СК на плотность капиллярной сети мышечной ткани у больных ОЭ.

Исследования проведены на биоптатах икроножной мышцы пораженной конечности 30 больных ОЭ до и через 3 месяца после внутримышечного введения аутологичных СК, мобилизованных G-CSF. Для выявления капилляров парафиновые срезы окрашивали иммуногистохимически с антителами к маркерам эндотелия — CD31, CD34 и фактору фон Виллебрандта (vWF). Далее производили подсчет числа мышечных волокон и капилляров и определяли их соотношение.

Результаты. CD31 и vWF присутствовали только в эндотелии сосудов, тогда как экспрессия CD34 была хорошо выражена как в эндотелии сосу-

дов, так и капилляров, что позволяет сделать вывод о целесообразности использования именно этого маркера для изучения капилляров скелетной мышцы человека. Проведенный морфометрический анализ позволил установить, что однократное введение аутологичных СК приводит к возрастанию плотности капиллярной сети в пораженных мышцах в среднем на 33,25 % ($p < 0,05$). Таким образом, аутотрансплантация СК периферической крови приводит к улучшению васкуляризации ишемизированной конечности путем стимуляции развития микроциркуляторного русла, что происходит, по-видимому, за счет дифференцировки трансплантированных СК в эндотелиоциты.

Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Медведев С.П.¹, Григорьева Е.В.¹, Малахова А.А.¹, Шевченко А.И.¹,
Савушкина Д.А.², Бернвальд В.В.², Соболев И.А.², Закиян С.М.¹

¹*Учреждение Российской академии наук Институт цитологии
и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск*

²*Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск*

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) получены из эмбриональных фибробластов кожи плода человека (9-я неделя беременности) методом ретровирусной трансдукции генетических конструкций экспрессирующих кДНК генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* мыши. Для повышения эффективности получения клонов ИПСК, был применен ингибитор гистондеацетилаз — 2-пропилвалериановая кислота (valproic acid), в концентрации 0,5 μ M. В результате трансдукции 1 млн. фибробластов наблюдали появление 500 первичных колоний, по фенотипу сходных с эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК) человека. При дальнейшем культивировании 200 колоний получены 18 стабильных линий ИПСК человека, четыре из которых (iPS-A24, iPS-A29, iPS-21L и iPS-30L) были детально проанализированы. Данные клоны имеют морфологию ЭСК человека, экспрессируют щелочную фосфатазу, эндогенные белки OCT4 и NANOG, а также поверхностные антигены TRA-1–60 и TRA-1–81. В результате ОТ-ПЦР анализа транскрипции 24 генов (*OCT4*, *NANOG*, *DPPA2*, *DNMT3*, *hTERT* и др.), являющихся маркерами ЭСК человека, обнаружено, что полученные ИПСК имеют идентичный с ЭСК человека паттерн экспрессии генов. Кариотипический анализ полученных линий ИПСК показал, что они имеют нормальный набор хромосом — 46, XY.

Таким образом, было показано, что экспрессия генов *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* и *Klf4* мыши в клетках человека, способна вызывать репрограммирование и образование стабильных клонов ИПСК по своим характеристикам аналогичных ЭСК человека. Использование низкомолекулярных химических соединений, таких как 2-пропилвалериановая кислота, существенно повышает выход первичных ЭСК-подобных колоний.

Аутологичные нейральные прогениторные клетки на основе пигментированных клеток глаза человека

Милюшина Л.А., Александрова М.А.

*Институт биологии развития им Н.К. Кольцова РАН,
лаб. проблем регенерации и экспериментальной нейробиологии*

Клетки пигментного эпителия (ПЭ) глаза человека наряду с клетками пигментированного эпителия цилиарного тела и клетками Мюллеровской глии сетчатки были отнесены к стволовым/прогениторным клеткам глаза.

Целью нашей работы являлось исследование мультипотентных свойств клеток ПЭ глаза плодов человека 9–11.5 недель развития (нр) и глаза взрослого человека, их способности к трансдифференцировке в нейрональном направлении *in vitro* при разных условиях культивирования. Полученные культуры анализировали с применением широкого спектра антител.

Установлено, что ПЭ глаза человека, как на 9–11.5 нр, так и во взрослом глазу, представляет собой гетерогенную популяцию клеток, в которой присутствуют три подтипа, отличающиеся по адгезивным свойствам, миграции, способностям к трансдифференцировке и ответам на факторы микроокружения. Первая субпопуляция клеток устойчиво сохраняют эпителиальные свойства. В этих клетках иммуноцитохимически выявлялись белки межклеточных контактов Sx43 и N-Cadherin. Клетки второго подтипа изменяют исходный морфотип, становятся фибробластоподобными. Эти клетки демонстрируют положительную окраску на маркеры нейральной дифференцировки: нестин, β III-тубулин и GFAP, и на маркеры фоторецепторных клеток рековерин. Третья субпопуляция представлена клетками способными образовывать свободноплавающие сферы. Иммуноцитохимический анализ показал, что сферы были сформированы Pax6 и нестин-позитивными клетками, и при стимуляции дифференцировки эти клетки демонстрируют активную мультипотентную дифференцировку в нейральном направлении.

Данная работа подтвердила и уточнила данные о влиянии факторов FGF и EGF на пролиферацию, миграцию и на трансдифференцировку клеток ПЭ глаза человека. Однако нами впервые была показана гетерогенность клеток ПЭ, поведение которых *in vitro* различны, что позволяет в зависимости от поставленных целей работать с той или иной субпопуляцией клеток ПЭ.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08–04–00081) и по контракту с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.512.12.2008.

Кардиомиопатия мышей *mdx* как модель для изучения терапии миокарда при помощи трансплантации аутологичных стволовых клеток костного мозга

¹Михайлов В. М., ²Мамаева Г. И., ¹Соколова А. В., ¹Зенин В. В.,
¹Фирсанов Ю. В., ¹Веженкова И. В.

¹Институт цитологии РАН, ²Больница №31, Санкт-Петербург

Кардиомиопатия мышей *mdx* является примером патологии миокарда, обусловленная мутацией белка дистрофина. Плейотропный эффект мутации включает в себя нарушение экспрессии более 1700 генов (Turk et al., 2005). По нашим данным удельная плотность митохондрий у кардиомиоцитов мышей *mdx* (0.274 ± 0.016) достоверно меньше чем таковая у кардиомиоцитов мышей C57Bl/6 (0.329 ± 0.018). Концентрация кардиомиоцитов в миокарде мышей *mdx* ниже на 20 % чем в миокарде мышей C57BL/6, что указывает на гипертрофическую форму кардиомиопатии. Для мышей *mdx* также характерен такой признак начальной стадии апоптоза как наличие в экстракте миокарда фрагментов ДНК размером 64–65 т. п. н. Таким образом, кардиомиоциты мышей *mdx* постоянно находятся в начальной стадии апоптоза, избегая вступления в деструктивную стадию (Михайлов и др., 1998, 2001, 2003, 2007). Термодинамический стресс (ТДС; плавание при +12° С) повреждает кардиомиоциты как мышей *mdx* так и мышей C57BL/6, вызывая появление в экстрактах миокарда низкомолекулярных фрагментов ДНК через 1 ч после ТДС. При этом ядра 40 % кардиомиоцитов мышей *mdx* реагировали с антисывороткой к фосфорилированной форме гистона H2Ax, маркера двунитевых разрывов ДНК. Суточная потеря кардиомиоцитов мышей *mdx* после ТДС была около 3 %. Через 1–24 ч после ТДС в миокарде мышей *mdx* зарегистрировано достоверное накоп-

ление Sca-1 позитивных клеток (Sca-1+ клетки). Представляет интерес установление участия Sca-1+ клеток в регенерации миокарда после ТДС. Мононуклеарные клетки, обогащенные на 27 % Sca-1+ клетками, были выделены из костного мозга мышей C57Bl/6 магнитным способом и введены внутривенно 9 мышам mdx возраста 1 год в дозе $(0.7 - 1.0) \times 10^6$, у которых предварительно были сделаны персональные электрокардиограммы (ЭКГ). Согласно нашим начальным исследованиям характерным признаком ЭКГ мышей mdx является отрицательная реполяризация пика Т, свидетельствующая о повреждении миокарда. Внутривенное введение Sca-1+ клеток уже через 12–13 сут восстанавливало нормальную позицию пика Т. Эффект сохранялся через 1.5 и 2 месяцев. Представляет интерес анализ участия трансплантированных стволовых клеток костного мозга в регенерации и стабилизации функции миокарда при кардиомиопатии.

Гранты РФФИ 05–04–46609 и 06–04–08338офи.ю.

Проникновение антисмысловых олигонуклеотидов в стромальные клетки жировой ткани мышцы

Молчанова Е.С.¹, Семенова М.Л.¹, Кошелева Н.В.^{1,2},

Молчанов А.Ю.¹, Сергеев С.А.¹

¹*Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова,*

²*НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН*

Стромальные клетки, полученные из жировой ткани (СКЖТ), по спектру экспрессии, пролиферативному потенциалу и способностям к дифференцировке в различные производные практически не отличаются от МСК и являются перспективными кандидатами для аутологических трансплантаций (Трактувей и др., 2006; Nakagami et al., 2006; Zuk et al., 2001). Одними из претендентов на роль ген-направленных агентов, влияющих на дифференцировочные процессы стволовых клеток, в том числе СКЖТ, являются антисмысловые олигонуклеотиды (АсОДН), способные образовывать прочные специфические комплексы с внутриклеточными мРНК и ингибировать процесс трансляции целевых белков. Имеются противоречивые сведения об эффективности и механизмах проникновения АсОДН в различные типы клеток (Daniel et al., 2005, O'Rear et al., 2005, Тимченко и др., 2006, Zheng et al., 2007). Целью нашей работы стало изучение проникновения АсОДН в СКЖТ мышцы. Исследовали проникновение олигонуклеотидов в первичную культуру СКЖТ, полученную из подкожной жировой ткани мы-

шей линии C57BL/6-Tg(ACSB-EGFP)1Osb/J, использовали два меченых флуорохромом TAMRA АсОДН к мРНК eGFP: АсОДН-А, формирующие вторичную структуру «шпилька», и АсОДН-Б, не имеющие вторичной структуры. АсОДН-Б практически не проникали в СКЖТ. Тогда как структурированные АсОДН-А хорошо проникали в СКЖТ и локализовались в цитоплазме, преимущественно в околядерной области, в районе Аппарата Гольджи. Полученные различия в проникновении структурированных и неструктурированных АсОДН и данные о локализации АсОДН в клетках, позволяют предполагать, что олигонуклеотиды проникают в СКЖТ посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Таким образом, наличие вторичной структуры, «шпильки», влияет на проникновение АсОДН в СКЖТ, что может быть учтено при разработке методов направленной дифференцировки этих клеток с использованием АсОДН.

Работа поддержана грантом компании Carl Zeiss, Германия №2-13.

Применение культивируемых стромальных (мезенхимальных) клеток костного мозга в регенеративной медицине

Николаенко Н.С.¹, Цупкина Н.В.¹, Деев Р.В.², Матюков А.А.³, Кухарева Л.В.¹, Бармашева А.В.³, Вилкова Ю.В.¹, Сахенберг Е.И.⁴, Александрова С.А.¹, Старикова Э.В.¹, Шатрова А.Н.¹, Зенин В.В.¹, Пинаев Г.П.¹

¹Институт цитологии РАН; ²Военно-Медицинская Академия им. С.М.Кирова; ³Санкт-Петербургский медицинский университет им. акад.И.П.Павлова; ⁴Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, Санкт-Петербург

В отделе клеточных культур института цитологии РАН (Санкт-Петербург) совместно с соисполнителями из других учреждений в течение нескольких лет ведется разработка технологии создания тканеинженерных эквивалентов с использованием мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) костного мозга крысы, кролика и человека. Нами были оптимизированы условия выделения этих клеток, была исследована их мультипотентность. Было показано, что клетки способны к терминальной дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. Были разработаны экспериментальные модельные раны (в черепе и других костных тканях кролика) и показано влияние трансплантируемых в коллагене ММСК на репаративный остеогистогенез в области дефекта теменных костей.

С целью поиска наилучшего носителя для трансплантации ММСК в костную ткань были исследованы коллагены, выделенные различными методами из шкуры овцы, быка и из хвостов крысы. Было установлено, что способность к миграции и остеогенной дифференцировке максимальны у клеток в коллагене из шкуры овцы. Кроме того, для трансплантации ММСК в область дефекта большеберцовой кости был использован деминерализованный костный матрикс. На его основе был создан тканеинженерный эквивалент кости, обеспечивающий полноценное совмещение преддифференцированных в условиях культивирования *in vitro* клеток и трехмерного материала-носителя.

Были начаты разработки тканеинженерных эквивалентов хрящевой ткани и ткани десны на основании индуцированных к дифференцировке ММСК и фибробластов кожи в коллагеновом геле.

Была показана способность ММСК к дифференцировке в кардиомиогенном направлении *in vitro* и ангиогенном направлении *in vivo* (при трансплантации клеток в ишемизированную сердечную мышцу). Было показано влияние эндотелиальных клеток на иммунофенотип и дифференцировку ММСК.

На основании полученных данных сделан вывод о перспективности создания тканеинженерных эквивалентов костной и других тканей на основе культивируемых ММСК в коллагеновом геле и в других носителях и применении таких эквивалентов в регенеративной медицине.

Метод органотипического культивирования тканей глаза позвоночных животных как способ для изучения клеточных источников для регенерации сетчатки

Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Поплинская В.А., Григорян Э.Н.

Институт биологии развития РАН

Для активации регенерационных потенциалов тканей глаза взрослых позвоночных за счет увеличения пролиферации и изменения фенотипа клеток мы использовали новый подход — органное ротационное культивирование *in vitro* изолированной сетчатки и заднего сектора глаза без сетчатки. Выбранный метод *in vitro* позволяет сохранять клеточное микроокружение, осуществлять долговременное культивирование, а также направленно манипулировать компонентами среды. Для сравнения пролиферативных возможностей клеток источников регенерации использованы два объекта

— взрослые тритон и крыса, т.е. животные с высоким и низким потенциалом к регенерации. При культивировании ИС взрослого тритона *Pleurodeles waltl* мы наблюдали миграцию клеток с периферии вовнутрь, в полость сформированных ИС сфероидов, и митозы. Отдельные митотические фигуры были отмечены и в ядерных слоях ИС. Пролиферация клеток ИС приводила к образованию пула нейробластов, способных к дальнейшим делениям, миграции и замещению погибших нейронов. Дополнительно проведенные иммуноцитохимические исследования позволяют отнести пролиферирующие клетки ИС тритона как к прогениторным клеткам ростовой зоны, так и клеткам макро- и микроглии. При культивировании ИС взрослой крысы, на фоне транслокации фоторецепторных клеток вовнутрь и их гибели, имела место пролиферация (BrdU метка и митозы) в наружной и внутренней областях ИС. Источником этих клеток, однако, не была как у тритона периферия сетчатки. Делящимися были макрофаги сетчатки, а также глиальные клетки, локализованные среди нейронов внутреннего ядерного слоя. При культивировании заднего сектора глаза без сетчатки ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) тритона и крысы демонстрировал как сходства, так и отличия. При проведении сравнительного анализа морфологии, пролиферации и экспрессии клетками маркерных специфических белков выяснено, что клетки РПЭ обоих видов животных способны при вымещении приобретать макрофагальный фенотип, а оставаясь в слое экспрессировать пан-нейральные маркеры. Однако только РПЭ тритона, но не крысы был способен к образованию в ряде случаев зачатка сетчатки, состоящего из 1–2-х рядов пролиферирующих и дедифференцирующихся клеток. Разработанный нами впервые подход оказался хорошим инструментом для изучения поведения и сравнения клеток источников регенерации сетчатки у взрослых низших и высших позвоночных.

Направленная биоостеоиндукция мезенхимальных клеток костного мозга

Попандопуло А.Г., Оберемко А.В., Оксимец В.М.

*ГУ «Институт неотложной и восстановительной хирургии
им. В.К. Гусака АМНУ»*

Костная ткань является производной мезенхимы и относится к обновляющейся ткани (Гололобов В. Г., 2003), дифференциальная организация которой представлена от стволовых до высокодифференцированных клеток. Предшественниками остеогенных элементов, как при физиологической,

так и при репаративной регенерации являются мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые при определенных условиях обладают способностью дифференцироваться по остеобластическому типу (Анохина Е. Б., 2007).

Культуру МСК получали из костного мозга, дополнительно осуществляли эксплантацию участка малоберцовой кости с надкостницей, первичное выделение из биоптата прогениторных клеток надкостницы (ПКН) с последующим культивированием. Микс-культуру получали путём совместного культивирования ПКН и МСК в соотношении 1:3. Экспериментальные исследования проводились с четырьмя группами клеточных линий: 1) контроль, МСК, культивируемые в стандартной среде; 2) МСК, культивируемые в разработанной нами среде; 3) микс-культура, стандартная среда; 4) микс-культура, разработанная нами среда. Также были проведены исследования, в которых разработанная нами среда добавлялась в микс-культуру после образования плотного монослоя (через 7 суток). Поверхность плазматических мембран предварительно помечалась прижизненными красителями РКН67 Green (для МСК) и РКН26 Red (для ПКН). В течение четырёх недель каждые 7 дней производили окраску на щелочную фосфатазу.

Данные наблюдений позволяют предположить, что ПКН: 1) *in vitro* в микс-культуре играют роль инициаторов начала процесса остеогенеза, определяя пространственное расположение МСК, характерное для культуры ПКН; 2) создают определённое микроокружение за счёт синтеза специфических веществ, являющихся продуктами их жизнедеятельности. В результате получаем не просто однородную культуру остеогенных клеток, как при химической индукции, например, дексаметазоном, но культуру клеток, дающую начало формированию *in vitro* костной ткани. В микс-культуре клетки сохраняют способность к пролиферации, что также является преимуществом такого метода направленной дифференцировки.

Управление нейтральной дифференцировкой трансплантируемого клеточного материала

Павлова Г.В., Ревущин А.В.

Учреждение Российской Академии Наук Институт биологии гена РАН

Развитие клеточных технологий дает новые пути решения проблем лечения дегенеративных заболеваний. Показана интенсификация регенера-

тивных процессов при системных и локальных введениях клеток костного мозга. Эти результаты позволяют надеяться на применение в клеточной терапии аутологичных клеток костного мозга или жировой ткани, что снимает проблему тканесовместимости и многие этические проблемы. В нашей лаборатории под руководством Леонида Ивановича Корочкина были начаты разработки методов подготовки и применения клеточного материала для аутологичной трансплантации животным с экспериментальной нейродегенерацией. Мы занимаемся поиском методов и факторов, обеспечивающих управление пролиферацией и дифференцировкой этих клеток в культуре, и после их трансплантации в мозг.

Методы включают ко-культивирование с клетками, содержащими индуцирующие факторы, добавление индуцирующих факторов в среду, воздействие трансгенного материала на дифференцировку прогениторных клеток. Была показана возможность применения кондиционных сред для дифференцировки стволовых клеток мезенхимального происхождения в сторону инсулин продуцирующих и нервных клеток. Кондиционированная среда была получена посредством культивирования клеток соответствующих органов животных в обычной культуральной среде. Например, для направления дифференцировки в сторону дофаминэргических нейронов применялась среда культивирования клеток черной субстанции мозга новорожденного поросенка.

Один из возможных путей усилить приживляемость и дифференцировку пересаженных клеток состоит в воздействии на ткани нейротрофических факторов, таких как GDNF, BDNF. Особый интерес представляет использование стволовых клеток, как носителей GDNF и BDNF для управления нейральной дифференцировкой не только трансплантируемых клеток, но и клеток предшественников в тканях пациента.

Конструкции, полученные на базе вектора EGFP-N 1 и содержащие гены белков GDNF, BDNF и GFP, были введены в эмбриональные клетки линии HEK-293. Эксперименты по трансплантации трансгенных и контрольных клеток в мозг подопытных мышей показали, что экспрессия трансгенов подавляет реактивный глиоз, вызванный травмой при введении клеток, а также экспериментальной локальной ишемией после введения эндотелина.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ, Миннауки, Минобразования

**β -катенин, p130 и E2f4 формируют функциональный комплекс
в мезенхимальных стволовых клетках**

Петров Н.С.,¹ Жидкова О.В.,¹ Сериков В.Б.,² Попов Б.В.¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

*²Санкт-Петербургская медицинская академия последипломного
образования Росздрава*

Возможность широкого использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в регенеративной терапии основана на эффективном управлении их дифференцировочным потенциалом, в формировании которого важную роль играет сигнальный путь Wnt/ β -катенин. При культивировании МСК мыши в среде с ионами лития или их кокультивировании с легочными эпителиальными клетками линии А-549 в условиях разделения клеточно-непроницаемой мембраной в МСК повышается уровень β -катенина, происходит его активация, увеличивается количество и накапливаются активные формы белка p130 (члена семейства продукта гена ретинобластомы) и транскрипционного фактора E2f4, индуцируется экспрессия легочных эпителиальных маркеров. p130 формирует комплекс с Gsk3 β и β -катенином, который обнаруживается как в интактных, так и в стимулированных ионами лития клетках. Образование комплекса p130-Gsk3 β - β -катенин подтверждается путем коиммунопреципитации p130 и β -катенина антителами к Gsk3 β , а p130 — антителами к β -катенину. Рисунок фосфорилирования p130, физически взаимодействующего с Gsk3 β и β -катенином при формировании комплекса, отличается от такового в общем клеточном экстракте. Эти данные предполагают функциональную роль комплекса p130-Gsk3 β - β -катенин в регуляции дифференцировки МСК.

Работа поддержана грантом 09—04—00595 РФФИ и государственным контрактом 02.512.11.2253.

Разработка методик дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека в миогенном и хондрогенном направлениях

Пономарева А.С.¹, Сургученко В.А.², Севастьянов В.И.²

¹Московский физико-технический институт
(государственный университет)

²ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И.Шумакова» Минздравсоцразвития

Получение преддифференцированных или дифференцированных культур клеток — одна из ключевых задач при использовании стволовых клеток (СК) в регенеративной медицине. Перспективным источником СК является жировая ткань.

Цель работы заключалась в разработке методик дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани человека в миогенном и хондрогенном направлениях в условиях *in vitro*.

Источником стволовых клеток служили образцы подкожно-жировой клетчатки человека. Получение культуры МСК включало в себя сочетание механической и ферментативной дезагрегации. Индукцию миогенной дифференцировки МСК осуществляли на 2 пассаже, средой содержащей DMEM, 10 % ЭТС, 5 % ЛС, дексаметазон, гидрокортизон, антибиотик/антимикотик. Контроль дифференцировки клеток проводили еженедельно на протяжении 6 недель с помощью антител Anti-human MyoD1, Anti-Myogenin и Anti-human Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (Dako, Дания).

Для индукции дифференцировки МСК в хондрогенном направлении использовали набор STEMPRO® Chondrogenesis Differentiation Kit (Invitrogen, США). Суспензию МСК во 2-м пассаже концентрацией 16×10^6 кл/мл рассеивали по 10 мкл в лунку 24-х луночной планшеты. После 2-х недель инкубации получали культуру клеток в виде микроагрегатов, хондрогенную природу подтверждали с использованием красителя Alcian Blue (Sigma, США).

Доказана эффективность разработанных методик для получения преддифференцированных клеток в миогенном и хондрогенном направлениях.

Получение инсулин-продуцирующих клеток из мультипотентных стромальных клеток (МСК) пупочного канатика человека

Спирова И.А.^{1,2}, Ржанинова А.А.^{1,2}, Гольдштейн Д.В.^{1,2}

¹ *Медико-генетический научный центр РАМН, Москва*

² *ЗАО «РеМеТэкс», Москва*

Одним из наиболее перспективных способов лечения сахарного диабета 1-го типа (СД1) является получение инсулин-продуцирующих клеток из альтернативных источников.

Из пупочного канатика (ПК) были изолированы и пассированы МСК, которые характеризовались фенотипом CD29⁺, CD44⁺, CD49a⁺, CD73⁺, CD90⁺, CD45⁻, CD31⁻. МСК трансфицировали рекомбинантным аденовирусом со встроенным ключевым геном панкреатической дифференцировки *Pdx1*. Сорбцию аденовируса проводили 2, 6, или 24 часа. В качестве контроля использовали нетрансфицированные клетки. Далее клетки культивировали в течение 3х дней, после чего из них выделяли мРНК и синтезировали кДНК. Наилучшее время адсорбции аденовируса определяли по уровню транскрипции гена *Pdx1* с помощью метода ПЦР в реальном времени. Уровень мРНК выравнивали по отношению к двум генам домашнего хозяйства *GAPDH* и β -*Actin*. Относительное количество мРНК рассчитывали с помощью $\Delta\Delta C_T$ метода.

Было обнаружено, что трансфекция *Pdx1* в МСК приводит к активации транскрипции генов, участвующих в пути дифференцировки стволовых клеток в β -клетки: *NeuroD*, *NGN3*, *MafA* и транскрипции гена инсулина на высоком уровне. В контроле транскрипция этих генов не наблюдалась.

Впервые продемонстрирована направленная дифференцировка МСК ПК в инсулин-продуцирующие клетки путем введения гена фактора транскрипции *Pdx1*, что позволяет предположить возможность их перспективного использования в клеточной терапии СД 1.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 09-04-00724-а.

Регенерация костей черепа после трансплантации тканеинженерной конструкции на основе аутологичных мультипотентных стромальных клеток, преддифференцированных в остеогенном направлении

Волков А.В.^{1,2}, Шустров С.А.^{1,2}, Алексеева И.С.³, Арутюнян И.В.^{1,4},
Ржанинова А.А.^{1,4}, Большакова Г.Б.², Гольдштейн Д.В.^{1,4}

¹ ЗАО «РеМеТэкс», Москва

² НИИ морфологии человека РАМН, Москва

³ ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Росмедтехнологий, Москва

⁴ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

В настоящее время в клинической практике широко распространены методы направленной регенерации костной ткани, в которых используют имплантационные материалы, обладающие остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами. В экспериментальном исследовании изучали сравнительную эффективность направленной регенерации костной ткани гранул медицинского гидроксиапатита («BioOss»), деминерализованного костного матрикса («Биоматрикс»), частично деминерализованного костного матрикса («Остеоматрикс») и тканеинженерной конструкции на основе аутологичных мультипотентных стромальных клеток, преддифференцированных в остеогенном направлении (по протоколу RMosteo-AT ЗАО «РеМеТэкс»). У кроликов массой 4 кг формировали полнослойные костные дефекты теменных костей до твердой мозговой оболочки, на поверхность которой помещали исследуемый материал с обогащенной тромбоцитами плазмой крови. Животных выводили из эксперимента на 120 сутки эксперимента. Образцы подвергали обычной гистологической проводке. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином-эозином.

Показано, что применяемые в клинической практике коммерческие остеопластические материалы не приводят к полноценной регенерации костей черепа, основной вклад в регенеративный процесс вносит материнская кость. При трансплантации тканеинженерной конструкции вся область костного дефекта была заполнена костной тканью, что демонстрирует более высокую эффективность данной биомедицинской технологии.

Исследование туморогенного потенциала культур мультипотентных стромальных клеток (МСК) и коммитированных хондробластов человека на лабораторных моделях Nude/Balb и SCID

Ржанинова А.А.^{1,2}, Мурашов А.Н.³, Новикова Н.И.³,
Кириенко Е.Е.^{1,2}, Гольдштейн Д.В.^{1,2}

¹ ЗАО «РеМеТэкс», Москва

² Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина
и Ю.А.Овчинникова РАН (Филиал), г. Пущино МО

Туморогенный потенциал клеточной культуры, используемой для трансплантации человеку, является важнейшей характеристикой, определяющей безопасность ее клинического применения. Выбор экспериментальной модели и линии позитивного контроля — основные параметры, определяющие чувствительность и достоверность методики тестирования туморогенности.

Исследовали 2 культуры МСК из костного мозга, 3 культуры стромальных клеток из жировой ткани и 5 культур хондробластов, выделенных из участка фиброзного кольца краевой пластинки межпозвоночного диска. В качестве положительного контроля была выбрана постоянная линия клеток злокачественной мезенхимальной опухоли человека А-204, которая не образует в организме иммунодефицитных животных опухолевых масс крупных объемов и обладает низкой метастатической активностью. Результаты исследования показали, что при подкожном введении 10^7 клеток мышам Nude/Balb через 15 дней трансплантаты опытных культур в месте введения не обнаруживались, клетки позитивного контроля также полностью элиминировались. Введение культур в аналогичных условиях мышам линии SCID СВ-17 выявило прогрессивный рост мезенхимальных опухолей в группе позитивного контроля (10/10), в опытных группах отмечали медленную регрессию трансплантатов, образование фиброзной капсулы и дифференцировку клеток. Таким образом, показано, что тестирование туморогенной безопасности культур мезенхимального происхождения целесообразно проводить на лабораторной модели мышей линии SCID, так как при использовании мышей Nude высока опасность получения ложноотрицательного результата.

Работа выполнена при финансовой поддержке Федерального агентства по науке и инновациям (госконтракт № 02.512.11.2221 от 04.07.2008).

Первый опыт применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани в области верхней и нижней челюстей

Алексеева И.С.¹, Волков А.В.², Кулаков А.А., Григорьян А.С.¹,
Ржанинова А.А.^{2,3}, Арутюнян И.В.^{2,3}, Гольдштейн Д.В.^{2,3}

¹ ФГУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Росмедтехнологий, Москва

² ЗАО «РеМеТэкс», Москва

³ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

Применение в клинической практике различных остеопластических материалов не всегда приводит к образованию необходимого объема костной ткани. Высокотехнологичным альтернативным имплантационным материалом может стать тканеинженерная конструкция (ТИК), содержащая аутологичные клетки пациента и биорезорбируемый матрикс различной природы. На базе ФГУ «ЦНИИС» Росмедтехнологий совместно с ЗАО «РеМеТэкс» проведено пилотное клиническое исследование новой биомедицинской технологии по восстановлению костных дефектов и дефицита костной ткани верхней и нижней челюстей (по протоколу RMosteo-AT, ЗАО «РеМеТэкс»). Клинический протокол костной пластики для дентальной имплантации состоит из нескольких этапов: создание с помощью 3D прототипирования и 3D компьютерного моделирования из биорезорбируемого частично деминерализованного костного матрикса модели костного блока, которая анатомически соответствует костному дефекту у пациента; заселение матрикса аутологичными МСК из жировой ткани, преддифференцированными в остеогенном направлении; трансплантация ТИК в место дефекта. В исследование было включено 7 пациентов (4 женщины и 3 мужчины в возрасте от 29 до 55 лет). У всех пациентов имелась выраженная атрофия костной ткани в области ранее утраченных зубов: уменьшение высоты и ширины альвеолярного отростка. Всем пациентам было проведено устранение дефектов костной ткани с помощью трансплантации ТИК. Клиническое исследование продемонстрировало отсутствие реакций на трансплантированную ТИК со стороны ложа трансплантата и слизистой оболочки полости рта. Выявлено ускорение сроков заживления операционной раны без врастания слизистой в трансплантат, замещение в течение 3–6 месяцев ТИК в организме пациента на собственную костную ткань, количество которой достаточно для установки имплантатов и первичной фиксации уже через три — четыре месяца после трансплантации ТИК.

Интракоронарная трансплантация мультипотентных стромальных клеток при постинфарктном кардиосклерозе

Фатхудинов Т.Х.^{1,3}, Слащева Г.А.², Большакова Г.Б.³, Хохлова О.Н.², Арутюнян И.В.¹, Илюшкина И.А.², Мурашев А.Н.², Гольдштейн Д.В.¹

¹ЗАО «Реметэкс», Москва

²Филиал ИБХ им. ак. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пущино

³НИИ морфологии человека РАМН, Москва

Трансплантация мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга является одним из перспективных методов лечения хронической сердечной недостаточности. Меченные PkH26 (Sigma) аутогенные МСК, 5 млн клеток в 1 мл физ. раствор, выделенные по стандартной методике, вводили интракоронарно крысам (n=20) через 30 суток после перенесенного острого инфаркта миокарда с реперфузией. В контрольной группе (n=20) вводили физ. раствор в равном объеме. Клетки вводили в полость левого желудочка при одновременном пережатии аорты. Через 2 и 4 недели после трансплантации в сердце маркированные клетки обнаруживали только в рубцовой ткани $55,5 \pm 17,7$ (49,5 % от общего числа выявленных клеток) и $34,5 \pm 13,4$ (38,7 %) клеток в поле зрения. В селезенке также наблюдали большое количество клеток $52,3 \pm 9,5$ и $43,8 \pm 13,1$, тогда как в печени и легких выявляли единичные клетки — $2,9 \pm 1,9$ и $1,4 \pm 1,7$ через 2 недели и $7,6 \pm 3,1$ и $3,1 \pm 4,0$ через 4 недели. В сердце трансплантированные клетки были выявлены только в рубцовой ткани и имели фибробластоподобный фенотип, они не дифференцировались ни в кардиомиоциты, ни в клетки кровеносных сосудов. Через 2 недели рубец в опытной группе составлял $4,5 \pm 4,7$ %, но достоверно не отличался от этого показателя в контрольной группе $7,1 \pm 4,1$ %. Через 4 недели относительный размер рубца на этих сроках был достоверно меньше в опытной группе $4,8 \pm 3,0$ %, в контрольной группе этот показатель составил $7,1 \pm 3,3$ %. Индекс дилатации левого желудочка на всех сроках в группе с введением клеток был достоверно меньше, чем в контрольной группе. Кроме того, индекс дилатации существенно уменьшился через 4 недели по сравнению с предыдущим сроком наблюдения — $15,2 \pm 10,0$ % и $8,0 \pm 4,4$ % соответственно. В исследуемые сроки в опытной группе достоверно толще была стенка ЛЖ в области рубца, чем в контрольной группе. Таким образом, трансплантированные МСК мигрируют в область рубца, стимулируют обратное ремоделирование левого желудочка, но не дифференцируются в кардиомиоциты и клетки кровеносных сосудов.

Исследование выполнено при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям РФ, ГК № 02.512.11.2336.

Тканеинженерные конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток костного мозга и пористых полилактидных носителей

Бухарова Т.Б.^{1,3}, Антонов Е.Н.², Фатхудинов Т.Х.^{1,4}, Попов В.К.², Волков А.В.^{1,4}, Попова А.В.², Баграташвили В.Н.², Гольдштейн Д.В.^{1,3}

¹ *ЗАО «РеМеТэкс», Москва*

² *Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН, Троицк*

³ *Медико-генетический научный центр РАМН, Москва*

⁴ *НИИ морфологии человека РАМН, Москва*

Поиск материалов и методов изготовления носителей тканеинженерных конструкций (ТИК) для быстрого и эффективного восстановления протяженных дефектов костной ткани является одним из важнейших направлений тканевой инженерии. Применение методов быстрого лазерного прототипирования позволяет синтезировать матрицы-носители из апробированных в медицинской практике материалов (эфиров органических кислот) с заранее заданной структурой в соответствии с архитектурой восстанавливаемой ткани. Использование компьютерного моделирования обеспечивает воспроизводимость параметров получаемых структур и позволяет изготавливать носители, соответствующие по форме геометрии дефекта.

В работе была изучена биосовместимость носителей из полимолочной кислоты, полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания. Для изготовления ТИК использовали мультипотентные стромальные клетки (МСК) костного мозга и носители в виде дисков диаметром 12 мм и высотой 4 мм, с порами размером 0,6x0,6 мм. Клетки культивировали на носителе 7 суток, их количество составляло ~ 300 тыс. клеток, витальность — не менее 80 %. МСК костного мозга прикреплялись и распластывались как на поверхности носителя, так и в порах. С помощью МТТ-теста показано отсутствие цитотоксического эффекта носителей.

Через 30 суток после трансплантации ТИК под кожу крысам внутри конструкции наблюдали образование рыхловолокнистой соединительной ткани с большим количеством кровеносных сосудов и высокой концентрацией незрелых клеток-предшественников. При этом в зоне трансплантации отсутствовали выраженная воспалительная инфильтрация, неопластические и другие патологические изменения.

Морфологические изменения в парауретральной области при введении тканеинженерной конструкции на основе стромальной фракции жировой ткани

Макаров А.В.^{1,2}, Арутюнян И.В.^{1,3}, Гольдштейн Д.В.^{1,3}

¹ЗАО «РеМеТэкс», Москва

²ГУ НИИ Морфологии человека РАМН, Москва

³ГУ Медико-генетический центр РАМН, Москва

В современной медицинской практике широко используются методы введения препаратов, восполняющих объём в области дефицита собственной соединительной ткани. Для локального формирования соединительной ткани в парауретральной области впервые предложено использовать инъекционную форму тканеинженерной конструкции (ТИК) на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани и желатиновой губки.

В экспериментальном исследовании использовали самок крыс Вистар, которым парауретрально вводили 0,5 мл суспензии, содержащей различные тканеинженерные конструкции. ТИК получали путем заселения желатиновой губки аутологичными, аллогенными и девитализированными МСК из жировой ткани; в качестве контроля — использовали введение только желатиновой губки.

Для оценки морфологических изменений в области трансплантации проводили морфометрическое исследование матрикса конструкции, клеток, инфильтрирующих область введения конструкций, коллагеновых волокон; кровеносных сосудов. Морфологическое исследование показало, что при использовании тканеинженерной конструкции, содержащей живые аутологичные клеточные культуры стромальной фракции жировой ткани, происходит формирование наибольшего количества коллагеновых волокон в области введения, при этом отмечена прямая корреляция между наличием трансплантированных клеток, количеством фибробластов и фиброцитов в области введения и площадью образованных коллагеновых волокон. Сравнительное исследование ТИК, содержащей девитализированные клеточные культуры показало незначительное образование коллагена в области введения, статистически значимо не отличающееся от группы, в которой вводился только матрикс без клеточной культуры.

Таким образом, данные, полученные в ходе экспериментального исследования, позволяют говорить об эффективности использования тканеинженерной конструкции, содержащей аутологичную клеточную культуру стромальной фракции жировой ткани для локального формирования соединительной ткани.

**Применение тканеинженерной конструкции
для лечения ложных суставов**

Шустров С.А.^{1,2}, Волков А.В.^{1,2}, Арутюнян И.В.^{1,3}, Петров М.А.⁴,
Ржанинова А.А.^{1,3}, Большакова Г.Б.², Гольдштейн Д.В.^{1,3}

¹ ЗАО «РеМеТэкс», Москва

² НИИ морфологии человека РАМН, Москва

³ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

⁴ ГУ ВПО РГМУ, Кафедра детской хирургии, Москва

На развитие патологического процесса в области повреждения кости главным образом влияет отсутствие грануляционной ткани, содержащей малодифференцированные клетки, а не низкий уровень местного кровообращения или недостаток факторов роста TGF β , PDGF и BMP 2/4.

В работе предложен метод лечения нарушения репаративного остеогенеза при повреждениях костей скелета с помощью трансплантации тканеинженерной конструкции. Для экспериментального изучения патологического процесса использовали модель ротационно-нестабильного остеосинтеза. В качестве стимулятора репаративного остеогенеза была применена тканеинженерная конструкция на основе аутологичных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани крыс, преддифференцированных в остеогенном направлении (по протоколу RMosteo-AT ЗАО «РеМеТэкс»).

Гистологическое исследование образцов кости, полученных от группы с трансплантацией тканеинженерной конструкции выявило образование молодой костной ткани во всем объеме трансплантата. Материал трансплантата полностью интегрирован между отломками кости и частично замещен ретикуло-фиброзной костной тканью. В группах сравнения с имплантацией материала и простым остеосинтезом образование костной ткани не выявлено.

Полученные гистологические данные продемонстрировали значительное улучшение репаративного остеогенеза в зоне перелома после 4 месяцев наблюдения.

Использование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга при атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки

Ромашенко А.Д.¹, Суздальцева Ю.Г.², Кальсин В.А.³, Ковалев А.В.³

¹ *Российский университет дружбы народов*

² *Российский государственный медицинский университет*

³ *Центральный институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*

В рамках программы внедрения инновационных медицинских технологий нами разработан и зарегистрирован в Российском авторском обществе комплекс биомедицинских технологий «Клеточные технологии в офтальмологии» за № 15217 от 25 мая 2009 г. на основе комбинированных высокотехнологичных офтальмологических операций, включающих забор тканей костного мозга, выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ), а также микрохирургическую операцию с трансплантацией клеточного материала.

Методом проточной цитофлуориметрии было установлено, что фибробластоподобные клетки, полученные в результате культивирования мононуклеарной фракции аспирата костного мозга, обладали следующим фенотипом: CD13⁺, CD34⁻, CD44⁺, CD45⁻, CD49b⁺, CD54⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD106⁺, CD117⁺, HLA-ABC⁺, HLA-DR⁻. Исследование способности клеток полученной культуры к дифференцировке показало, что в среде дифференцировки в жировую ткань МСК КМ способны активно накапливать жировые вакуоли; при культивировании в микромассе с добавлением факторов дифференцировки в хондроциты (TGF-beta) МСК КМ способны образовывать плотную оформленную структуру, характеризующуюся наличием значительного количества протеогликанового экстрацеллюлярного матрикса, содержащего коллаген 2 типа; при добавлении факторов дифференцировки в остеобласты МСК КМ способны активно накапливать фосфаты кальция в вакуолях с образованием характерных по морфологии локусов окостенения.

В целях обеспечения безопасности использования полученные МСК КМ подвергали ПЦР-анализу на отсутствие провирусной ДНК и вирусной РНК ВИЧ-1 и ВИЧ-2; РНК вируса гепатита С; ДНК вируса гепатита В; вирусов простого герпеса 1–2-го типов; цитомегаловируса; вируса Эпштейн-Барр; микоплазмы; токсоплазмы.

12 пациентам в возрасте от 20 до 68 лет с атрофией зрительного нерва различного генеза (нисходящая атрофия, глаукома) и пигментной дегене-

рацией сетчатки с остротой зрения от 0,01 до 0,1 после стандартного лечения, которое оказалось не эффективным, проводили микрохирургическую операцию по трансплантации 10 млн аутологичных МСК КМ ретробульбарно и в субтеноновое пространство обоих глаз. Эффективность трансплантации МСК КМ оценивали раз в месяц в течение полугода. В период наблюдения у пациентов не выявлено никаких осложнений, в то же время улучшение остроты зрения по сравнению с исходным составило от 0,05 до 0,7 соответственно.

Таким образом, проведенные клинические исследования показали, что использование суспензии МСК КМ для лечения атрофии зрительного нерва и пигментной дегенерации сетчатки является единственным на сегодняшний день эффективным и патогенетически обоснованным способом лечения.

Сравнительная оценка устойчивости мезенхимальных стромальных клеток к различному содержанию кислорода в среде культивирования

Рылова Ю.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

*Учреждение Российской академии наук
Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем РАН*

Мезенхимальные стромальные клетки (лМСК), в связи с их высоким пролиферативным потенциалом и пластичностью, в настоящее время являются привлекательным материалом для использования в тканевой инженерии. Изменение содержания O_2 внутри тканевых композитов при заселении их клетками *in vitro* может серьезно нарушить жизнеспособность последних. Целью данной работы являлось сравнение морфологических особенностей, иммунофенотипа, жизнеспособности и клеточного прироста лМСК, культивируемых при содержании 1%, 3%, 5% и 20% O_2 в среде.

В исследовании использовали две линии лМСК, постоянно культивируемые в условиях (20%) и (5%) O_2 . С первого пассажа обе клеточные линии дополнительно подвергали воздействию низкого содержания O_2 (1% и 3%). Прирост клеток после перемещения из 20% в 1% и 3% O_2 превышал таковой для контроля более, чем в 3 раза. Клеточный прирост при 5% O_2 был в 2 раза меньше, чем после перемещения из 5% в 1% и 3% O_2 . В сравниваемых клеточных популяциях почти 100% клеток экспрессировали CD73. Доля лМСК, экспрессирующих CD90 не изменялась

при снижении содержания O_2 с 5% до 3% и уменьшалась в 2 раза в условиях 1% O_2 . При перемещении ЛМСК из 20% в 1% и 3% O_2 количество клеток, экспрессирующих CD90 уменьшилось практически в 2 раза. Жизнеспособность клеток при всех используемых концентрациях O_2 оставалась высокой и составляла более 90%.

Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что при использовании ЛМСК в тканевой инженерии, можно будет обеспечить создание биоинженерных фрагментов, заселенных клетками сохраняющими высокую жизнеспособность и пролиферативную активность.

Работа выполнена при поддержке контракта № 02.522.11.2006 Роснауки и программы ОБН РАН.

Стволовые клетки эктомезенхимы зачатка зуба мудрости человека для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний

Салафутдинов И.И.¹, Шафигуллина А.К.², Ризванов А.А.^{1,2}

¹Казанский государственный университет, ²Казанский государственный медицинский университет

В настоящее время перспективным клеточным материалом для терапии различных заболеваний являются стволовые клетки эмбрионального (embryonic stem cells - ESC) и постнатального (клетки костного мозга, жировой ткани, мононуклеары пуповинной крови и т.п.) происхождения. Применение ЭСК связано с этическими и политическими ограничениями, а также с вопросами их биобезопасности. В то же время использование стволовых клеток взрослого организма (adult stem cells – ASC) сопряжено с трудностями их получения и ограниченным пролиферационным и дифференциальным потенциалом.

Альтернативным источником ASC могут выступать стволовые клетки, выделенные из эктомезенхимы зачатков третьих моляров (зубов мудрости) человека, часто удаляемых с целью предупреждения стоматологических осложнений. Главным преимуществом данных клеток является доступность, высокая пластичность, способность дифференцироваться в различные клеточные типы, в том числе в нейрональном направлении. В проведенных нами исследованиях показано, что данная популяция клеток экспрессирует поверхностные антигены, характерные для мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (CD29+, CD73+, CD90+, CD105+, CD14-, CD34-, CD44, CD45-, CD133-, CD166-) и высокий уровень факторов транскрипции, иг-

рающих ключевую роль в поддержании клеток в дедифференцированном состоянии (*sox2*, *c-myc*, *klf4*). Показано, что стволовые клетки эктомезенхимы зачатков зубов мудрости оказывают нейропротекторное действие на *in vitro* модели нейробластомы человека SH-SY5Y. Высокий пролиферационный и дефференционный потенциал делает их привлекательным клеточным материалом для генно-клеточных приложений. Для генетической модификации нами были созданы двукассетные генетические конструкции на основе плазмиды pBudCE4.1, экспрессирующие факторы роста VEGF, FGF2 и GDNF отдельно и в различных комбинациях (pBud-VEGF-FGF2, pBud-VEGF-GDNF, pBud-FGF2-GDNF). Эффективность экспрессии рекомбинантных генов подтверждена ПЦР в реальном времени, Вестерн-блоттингом и иммуногистохимией.

Полученные генетически модифицированные клетки служат основой для доклинических исследований терапии нейродегенеративных заболеваний на модели трансгенных мышей, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза и болезни Альцгеймера.

Формирование хрящеподобных микромасс стромальными клетками костного мозга на гидрофобной поверхности

Сахенберг Е.И.¹, Николаенко Н.С.², Пинаев Г.П.²

¹*Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет,*

²*Институт цитологии РАН Санкт-Петербург*

Настоящая работа посвящена разработке способов и условий культивирования стромальных клеток костного мозга (СККМ) для их хондрогенной дифференцировки.

Первой стадией хондрогенной дифференцировки является образование клеточных скоплений, так называемых микромасс. С этой целью клетки осаждают центрифугированием в пробирке с коническим дном, а затем добавляют к ним индукционную хондрогенную среду. При этом межклеточное взаимодействие увеличивается и через некоторое время на дне пробирки образуется микромасса.

Воздействие центрифугированием может негативно сказаться на жизнеспособности, пролиферации и эффективности дифференцировки клеток. Кроме того, в пробирке сложно проследить процесс формирования микромассы — для этого её нужно перенести на плоскость.

Чтобы избежать центрифугирования СККМ крысы были посеяны в большой плотности на силиконизированную 96-луночную плату, то есть на гидрофобную поверхность. Туда же была добавлена хондрогенная среда. Таким образом, были созданы условия, при которых межклеточные взаимодействия превалировали. Через некоторое время клетки образовали микромассы.

Для того, чтобы проверить действие отдельных компонентов индукционной хондрогенной среды на формирование микромасс, нами было проведено исследование формирования СККМ микромасс на гидрофобной поверхности под действием различных компонентов комплексной хондрогенной среды: TGF-Вдексаметазон и инсулин-трансферрин-селенит. В результате оказалось, что наилучшее формирование микромасс происходит в полной хондрогенной среде, включающей все компоненты.

Для сравнения на гидрофобную поверхность наносили клетки хряща и фибробласты кожи. При этом клетки хряща образовывали микромассы, сходные с микромассами, сформированными СККМ, в то время как фибробласты кожи образовывали более рыхлые микромассы с ореолом распластанных клеток. Таким образом, вышеописанное поведение клеток ещё раз доказывает, что формирование микромасс является характерной особенностью клеток дифференцирующихся в хондрогенном направлении.

Регенерация костной ткани после трансплантации аутологических мезенхимных стромальных клеток (МСК)

Мамонов В.Е., Сац Н.В., Шипунова И.Н., Свинарева Д.А.,
Ряшенцев М.М., Проскурина Н.В., Дризе Н.И.

УРАМН Гематологический Научный Центр РАМН, Москва, Россия

Введение Для восстановления дефектов кости используют носители из синтетических или натуральных биоматериалов. МСК способны дифференцироваться в клетки кости, хряща, жировой ткани. Комбинация МСК с различными носителями значительно улучшает восстановление больших костных повреждений. Целью данной работы было изучить эффективность регенерации кости с помощью МСК или МСК в комбинации с МСК индуцированных *in vitro* в остеогенном направлении (остео-МСК) и бионосителей после трансплантации в место повреждения лучевой кости кролика.

Материалы и методы МСК получали из костного мозга кроликов. Остеогенную дифференцировку МСК индуцировали *in vitro* в течение 4 дней

(остео-МСК). 1/5 часть трансплантируемых МСК маркировали с помощью концентрированного (10^8 вирусных частиц/мл) лентивирусного LeGO вектора кодирующего зеленый белок (EGFP) и 1/5 часть остео-МСК с помощью LeGO вектора кодирующего красный белок (mCherry). В область повреждения (резекция 1 см лучевой кости) имплантировали аутологичные МСК в комбинации с остео-МСК, губкой ИНДОСТ (POLYSTOM) и гранулами PRODENS® (WMT). За динамикой изменений в области резекции следили в течение 18 недель. Каждые 4 недели проводили рентгенологические исследование поврежденных конечностей. Через 18–22 недели новообразованные участки кости анализировали на наличие маркированных клеток методом ПЦР, морфологию изучали на гистологических срезах.

Результаты Через 4 недели после трансплантации МСК с носителями в области повреждения наблюдался остеогенез. У контрольных животных, в отсутствие клеток и носителей, в течение 7 месяцев не наблюдалось никаких видимых изменений в регенерации повреждения. Имплантация только губки ИНДОСТ (POLYSTOM) и гранул PRODENS® без МСК не приводила к эффективному образованию кости. Присутствие МСК стимулирует образование кости на протяжении 18 недель. Не было выявлено отличий в регенерации кости между МСК и комбинации МСК с остео-МСК. Только EGFP-маркированные МСК обнаружены в новообразованной кости. Маркер EGFP также был обнаружен в соединительной ткани окружающей место регенерации. Эти данные подтверждают участие МСК в формировании кости и соединительной ткани. Индуцированные к остео-дифференцировке МСК перед трансплантацией не были выявлены в восстановленной костной ткани через 22 недели.

Заключение Комбинация МСК с носителями способствует эффективной регенерации кости. Доказано непосредственное участие МСК, но не остео-МСК в регенерации костной ткани.

Пролиферативный потенциал человеческих мезенхимных стромальных клеток (мск) доноров и больных апластической анемией

Шипунова И.Н., Петрова Т.В., Свинарева Д.А., Сац Н.В., Дризе Н.И.

УРАМН Гематологический Научный Центр РАМН, Москва, Россия

Введение МСК — мультипотентные стромальные клетки, выделенные из костного мозга (КМ), способные дифференцироваться в различные клетки мезенхимного происхождения. Для человеческих МСК не доказана

способность к самоподдержанию. Целью работы было изучить пролиферативный потенциал МСК доноров маркированных лентивектором и МСК больных апластической анемией (АА).

Материалы и методы КМ от доноров и больных АА получены после подписания информированного согласия. Остеогенную и жировую дифференцировки получали на 1–4 пассажах МСК после соответствующих индуцирующих воздействий. Через 2–4 часа после первого пассажа МСК доноров трансдуцировали лентивирусным LeGO вектором содержащим зеленый белок (EGFP) в течение 6 часов. Прикрепленные к пластику подслои длительных культур КМ (ДККМ) заражали этим же вирусом в течение ночи. Для клонирования МСК 1, 2 или 10 клеток на лунку рассаживали в 96-луночную плату, при этом облученные в дозе 40Гр МСК использовали как фидеры (1000 клеток/лунку). Подслои ДККМ через 2 недели после заражения рассаживали в 96-луночную плату по 10000 клеток на лунку.

Результаты Кинетика роста не отличается в EGFP-позитивных и негативных культурах МСК и ДККМ. Количество маркированных клеток по мере пассирования уменьшается. Эффективность клонирования EGFP-негативных МСК не отличается от EGFP-позитивных ($13.7 \pm 6.9\%$ и $14.5 \pm 7.0\%$). Все клоны МСК способны достигать конфлуентного монослоя в 96-луночной плате, затем способны совершить еще 5 митозов и только 1 из 22 клонов поделится в шестой раз. Добавление в культуру bFGF не увеличивает пролиферативный потенциал МСК. Время, необходимое для образования конфлуентного монослоя после посадки клеток КМ, примерно одинаковое у культур МСК доноров и больных АА и не отличается при дальнейшем пассировании. Суммарная клеточная продукция также схожа на первых 6 пассажах, затем донорские МСК замедляют рост, тогда как МСК больных АА продолжают пролиферировать в течение еще 6 пассажей. Такой эффект может быть связан с повышенной экспрессии *bFGF* в МСК больных АА по сравнению с МСК доноров (относительный уровень экспрессии в культурах больных АА — 0.78 ± 0.15 , в культурах доноров — 0.55 ± 0.09).

Заключение МСК обладают высоким, но ограниченным пролиферативным потенциалом и не способны к самоподдержанию в культуре. МСК больных АА активированы и способны к более длительной пролиферации чем МСК доноров.

Сравнение поведения нейральных стволовых / прогениторных клеток (НСПК) и клеток пигментного эпителия глаза при инъекции *in vivo* и *in vitro*

Сергеев С.А.¹, Кошелева Н.В.^{1,2}, Сабурин И.Н.², Ревещин А.В.², Семенова М.Л.¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

²НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия

Для лечения нейродегенеративных заболеваний сетчатки успешно применяются методы трансплантации клеток. Однако механизмы репарации повреждений инъекционными клетками все еще до конца не ясны. Поэтому необходимо создание адекватных модельных систем, позволяющих проследить судьбу трансплантированных клеток на любых сроках после введения. Нами были предложены модели трансплантации GFP+ НСПК 4-го пассажа и клеток пигментного эпителия (ПЭ) 6-го пассажа мышей линии C57BL/6-Tg (ACTB-EGFP)/Osb/J в эксплантационную культуру сетчатки (37°C, 5% CO₂, DMEM/F12, + глутамин, +dFGF и EGF (10 нг/мл), B27, N2 и 10% Fetal clone) и их инъекции интравитриально (10000 клеток/2мкл), ретробульбарно (300000 клеток/10 мкл) и супрахориоидально (300000 клеток/2 мкл) крысам линии *Campbell* в возрасте 14 дней с последующим анализом экспрессии В-III-тубулин и GFAP

При трансплантации клеток ПЭ *in vivo* отмечено выраженное стабилизирующее влияние на процессы дегенерации, развивающиеся у крыс *Campbell* и сохранение высокого уровня функциональной активности сетчатки, однако при трансплантации НСПК эффект был в 3 раза меньше (то же при инъекции кондиционированной среды). Напротив *in vitro*, НСПК гораздо лучше пролиферировали, образуя длинные нейриты, мигрировали на большие расстояния в первые часы после инъекции и к 3-му дню дифференцировались в нейроны и глию, в то время как клетки ПЭ оставались в месте инъекции и не изменяли свою морфологию. При нанесении клеток на поверхность эксплантата сетчатки наблюдалась обратная картина — НСПК слабо мигрировали и не дифференцировались спустя 10 дней после инъекции, а клетки ПЭ активно пролиферировали и распластывались по поверхности эксплантата. Таким образом, для успешной репарации сетчатки необходимо привнесение клеток в свойственное им микроокружение. Оптимальна трансплантация ПЭ — на поверхность сетчатки — супрахориоидально; НСПК — в саму нейросетчатку.

Работа выполнена при поддержке гранта CarlZeiss № 2-15

О возможной роли мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) в тканеинженерных конструкциях (ТИК) на основе натуральных, синтетических керамических и композиционных материалов при замещении костных дефектов у животных

Сергеева Н.С., Франк Г.А., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А.

ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»

Цель исследования — анализ механизмов остеогенеза при замещении костных дефектов у лабораторных животных искусственными и натуральными биоматериалами самостоятельно и в составе ТИК с аутологичными ММСК.

Материалы и методы. В работе использовали гранулированные (крысы) и цельные (бараны) синтетические биоматериалы: пористую биокерамику на основе карбонатгидроксиапатита (КГА), биокомпозит — высокопористый матрикс из среднемолекулярного хитозана, армированный гранулами КГА, и натуральный коралл (НК) сем. Асгорога. Создавали дефекты: ограниченный — остеотомия голени крысы и критический — сегментарная резекция бедренной кости барана. Для получения ТИК аутологичные ММСК животных (II–IV пассаж) переносили на образцы материалов и культивировали в течение 7–10 (крысы) и 14–21 (бараны) суток. Оперативные вмешательства проводили под общей анестезией. В фиксированные сроки животных выводили из эксперимента, область дефекта с окружающими тканями фиксировали и декальцинировали. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином и проводили световую микроскопию.

Результаты. Установлено, что закрытие костного дефекта у животных при имплантации перечисленных материалов происходит путем периостального остеогенеза и завершается в сроки 6–12 мес. Компактная костная ткань у крыс образуется уже через 9 нед. после операции. У барана через 6 мес. вещество НК замещается компактной костной тканью с формированием органотипических структур (остеонов). Использование ТИК с аутологичными ММСК на основе искусственных керамических, композиционных и натуральных материалов в гранулированной форме или в виде цельных имплантатов существенно сокращает сроки замещения костных дефектов за счет того, что дополнительно к периостальному включается энхондральный остеогенез, что приводит к образованию костной ткани *de novo* по всему объему дефекта и в итоге — органотипическому замещению дефекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы, Государственный контракт № 8/3–316н-06.

Восстановление структуры нейромышечных соединений скелетных мышц мышей mdx после клеточной терапии стволовыми клетками костного мозга

Соколова А.В., Зенин В.В., Михайлов В.М.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Мыши mdx являются экспериментальной моделью мышечной дистрофии Дюшенна, вызываемой мутацией в гене белка дистрофина. Для поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) мышей mdx характерны высокий уровень гибели и нарушение структуры нейромышечных соединений (НМС). Целью работы было исследование влияния внутримышечной трансплантации стволовых клеток костного мозга (СККМ) на структуру НМС мышей mdx на фоне изменения других признаков дифференцировки ППМВ. В работе использовали сингенные Lin (-) СККМ, полученные путем истощения костного мозга мышей C57BL/6 от дифференцированных клеток магнитным способом на системе Dynal (Norway) смесью антител Caltag (США). Полученные Lin (-) СККМ инъецировали в 8–9 точек M. quadriceps femoris мышей mdx в дозе $(0,5–1,0) \cdot 10^6$ клеток на мышцу. Мышцы исследовали через 4, 8, 16 и 24 недели (нед) после трансплантации. Область НМС на продольных и поперечных срезах мышц определяли при помощи тетраметилродамин-В-бунгаротоксина (Biotium, USA), который специфически связывается с ацетилхолиновыми рецепторами (АХР). Через 4 нед после трансплантации наблюдалось снижение доли погибших ППМВ. Доля ППМВ без центрально расположенных ядер достоверно возрастала, начиная с 8 нед. Доля ППМВ, содержащих дистрофин, достоверно увеличивалась по сравнению с контролем только начиная с 16 нед. Также происходило изменение структуры НМС. Через 4 нед после трансплантации в мышцах мышей mdx площадь НМС на поперечных срезах мышц увеличилась с $78,4 \pm 5,1$ мкм² до $106,9 \pm 3,4$ мкм², что соответствует площади НМС нормальных мышей C57BL/6 — $102,8 \pm 3,0$ мкм². На продольных срезах мышц через 4 нед было зарегистрировано увеличение площади отдельных кластеров АХР, составляющих НМС, с $58,0 \pm 3,9$ мкм² до $80,0 \pm 4,9$ мкм². Одновременно происходило уменьшение количества этих кластеров с $4,7 \pm 0,3$ до $3,7 \pm 0,1$. Через 16 нед после трансплантации наблюдалось увеличение количества кластеров АХР, составляющих НМС, с 3,7 до 4,7, и их размеров до $93,9 \pm 4,6$ мкм². При этом произошло значительное увеличение общей площади НМС до $666,0 \pm 46,1$ мкм², достоверно превосходящей величину характерную для НМС дикого типа — $403,8 \pm 77,1$ мкм².

Таким образом, *Lip (-)* СККМ дикого типа вызывают изменение структуры НМС скелетных мышц у мутантных мышей *mdx*, приближая её к структуре НМС ППМВ мышей C57Bl/6. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты 05–04–49609, 06–04–08388офи, и контракта ГК № 02.512.11.2219 Федерального агентства по науке и инновациям.

Результаты применения трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации (ТМЛР) в сочетании с трансплантацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга у повторных больных ИБС с диффузным поражением коронарного русла

Бокерия Л.А., Беришвили И.И., Солнышков И.В., Вахромеева М.Н.

НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева РАМН, Москва

Повторные операции у больных ИБС с возвратом стенокардии сопровождаются высокой летальностью и высокой частотой осложнений. В работе представлены результаты ТМЛР в сочетании с трансплантацией аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, выполненных в качестве повторного вмешательства у больных ИБС с поражением дистального русла.

Цель исследования: изучить результаты выполнения альтернативных методов лечения у повторных больных.

Материалы и методы: В исследование включены повторные больные, оперированные в Институте коронарной и сосудистой хирургии НЦ ССХ им. А.Н. Бакулева за период с июня 2005 года по настоящее время. Всем больным была выполнена трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация (ТМЛР) в сочетании с введением аутологичных мезенхимальных стволовых клеток. В 2-х случаях была выполнена только ТМЛР с введением стволовых клеток, а в 2-х случаях — ТМЛР с введением стволовых клеток в сочетании с миниинвазивной реваскуляризацией миокарда (МИРМ). Методы исследования включали в себя ЭКГ, ВЭМ, ЭхоКГ исследование, а также изучение данных перфузии миокарда с помощью синхронизированной с ЭКГ однофотонной эмиссионной компьютерной томографии миокарда ЛЖ (синхро-ОФЭКТ). Все больные обследованы с помощью анкет качества жизни SF-36. Приводим результаты обследования больных в сроки до 1 года и более.

Результаты: Мы не имели летальных исходов ни на госпитальном этапе, ни в отдалённые сроки. За анализируемый период не было случаев жиз-

неугрожающих нарушений ритма сердца, повторных инфарктов миокарда, возвратов стенокардии и регоспитализаций. Достоверно снизился ФК стенокардии с 3,25 до 0,33 через 12 месяцев после операции ($p=0,0001$) и среднесуточная потребность в нитроглицерине с 4,5 до 0,25 ($p=0,01$). Общая ФВ ЛЖ увеличилась недостоверно [как при нагрузке (с 41,5 % до 45,5 %; $p=0,85$), так и в покое (с 53 % до 58 %; $p=0,5$)], очевидно из-за малого числа наблюдений. Толерантность к физической нагрузке достоверно увеличилась с 75Вт до 115,6Вт ($p=0,003$). Физическое и психо — эмоциональное состояние больных достоверно улучшились (с 38,1 до 77,5; $p=0,03$; и с 42,7 до 81,1; $p=0,004$ соответственно). Выявлено достоверное снижение ФК стенокардии, среднесуточной потребности в нитроглицерине и улучшение толерантности к физической нагрузке и качества жизни.

Выводы: использованная нами методика лечения повторных больных с диффузным поражением коронарных артерий представляется вполне жизнеспособной альтернативой в группе пациентов, у которых выполнение повторного АКШ сопровождается высокой летальностью и высокой частотой осложнений. Сказанное не может быть отнесено к больным с критической массой рубцово-измененного миокарда без достоверных зон гибернированного миокарда.

Старение вызывает подавление ангиогенных свойств стромальных клеток жировой ткани

Старостина Е.Е., Ефименко А.Ю., Калинина Н.И.,
Парфенова Е.В., Ткачук В.А.

Факультет Фундаментальной Медицины МГУ им. М.В. Ломоносова

Введение. Среди мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток взрослого организма стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) считаются одними из самых перспективных для применения в клеточной терапии. Было показано, что они обладают способностью стимулировать рост кровеносных сосудов, в том числе путем секреции ангиогенных факторов роста. Однако различные факторы, включая возраст пациентов, могут оказывать влияние на их функциональные свойства. Поэтому целью нашей работы было оценить влияние возрастного фактора на пролиферацию, жизнеспособность и ангиогенную активность СКЖТ.

Материалы и методы. СКЖТ были выделены из жировой ткани мышечной линии BalB/c, возраст животных составлял 2 месяца (СКЖТмол,

n = 9) или 18 месяцев (СКЖТстар, n = 9). Клетки культивировали до 2 пассажа. Затем в течение 48 часов их выращивали в условиях 1 % (гипоксия) или 20 % (нормоксия) содержания кислорода. Пролиферацию клеток оценивали с помощью коммерческого МТТ теста (Invitrogen). Длину теломер определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью проточной цитофлуорометрии по связыванию аннексина-V и накоплению 7-аминоактиномицина D. Анализ изменения экспрессии генов проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. Ангиогенную активность суммарных продуктов секреции клеток оценивали по влиянию кондиционированной среды (КС) на образование капиллярноподобных структур эндотелиальными клетками (HUVES) на Матригеле *in vitro*.

Результаты. СКЖТ старых животных обладают в 2 раза меньшим пролиферативным потенциалом по сравнению с клетками молодых животных. Длина теломер у клеток старых животных была в 3 раза меньше по сравнению с СКЖТ молодых мышей. Более того, в популяции СКЖТ старых животных доля клеток, находящихся на разных стадиях апоптоза была в 3 раза больше по сравнению с клетками молодых животных. Содержание мРНК фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), плацентарного фактора роста (PlGF) было статистически значимо больше в СКЖТмол, в то время как уровень фактора роста гепатоцитов (HGF) был выше в СКЖТстар. Гипоксия приводила к выравниванию содержания мРНК HGF в СКЖТмол и СКЖТстар. Экспрессия антиангиогенных факторов эндостатина и тромбоспондина значимо не отличалась в клетках от животных разного возраста и в схожей степени снижалась в гипоксических условиях. Наблюдалось статистически значимое повышение факторов системы урокиназы (урокиназа, рецептор к урокиназе, металлопротеиназы 2 и 9 типов, ингибитор активатора плазминогена-1) в СКЖТстар по сравнению с СКЖТмол как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. Суммарная длина капиллярноподобных структур, образованных HUVES на Матригеле в присутствии КС от СКЖТмол, была статистически значимо больше, чем от СКЖТстар, что свидетельствует о более выраженной секреции ангиогенных факторов клетками молодых животных. В клетках, культивированных в условиях гипоксии, способность стимулировать образование таких структур повышалась в равной степени.

Таким образом, при старении происходит подавление пролиферативной активности и жизнеспособности стромальных клеток жировой ткани, а также продукции ангиогенных факторов этими клетками. Однако стимуляция ангиогенного потенциала клеток под действием гипоксии не зависит

от возраста, что указывает на то, что культивирование клеток перед трансплантацией в условиях пониженного содержания кислорода может повышать эффективность клеточной терапии.

Циркулирующие прогениторные клетки в условиях стимуляции ангиогенеза у больных с хронической ишемией нижних конечностей

Талицкий К.А., Булкина О.С., Арефьева Т.И., Воробьева О.Н.,
Балахонова Т.В., Самко А.Н., Филатов Д.Н., Елисеев А.О.,
Кухарчук В.В., Парфенова Е.В., Карпов Ю.А.

*Российский кардиологический научно-производственный
комплекс МЗ РФ*

Введение. Терапевтический ангиогенез — перспективный метод лечения для пациентов с хронической ишемией нижних конечностей, не являющихся кандидатами для реваскуляризации. Значительную роль в развитии ангиогенного эффекта терапии отводят эндотелиальным клеткам-предшественникам, в связи с чем представляет интерес оценить динамику уровней циркулирующих клеток-предшественников (ЦКП) при стимуляции ангиогенеза в клинических условиях.

Материалы и методы. 20 больных 50–76 лет с хронической ишемией нижних конечностей атеросклеротического происхождения (Fontaine IIb-IV) были рандомизированы в группы генной терапии (ГТ), клеточной терапии (КТ), либо в группу контроля (К). В группе ГТ больным в ишемизированные мышцы конечностей вводили плазмидную ДНК, включающую кодирующую часть гена фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-165). В группе КТ больным вводили аутологичную мононуклеарную фракцию крови, полученную путем афереза после мобилизации нейпогеном. Больные контрольной группы получали стандартную терапию. Всем больным проводились сеансы тренировочной ходьбы на тредмиле. Содержание ЦКП оценивалось с помощью поточной цитометрии на основании фенотипа CD45-CD34+CD133+.

Результаты. Через 1 месяц в группе КТ у одной больной с критической ишемией конечности наблюдалось заживление трофической язвы. В группах ГТ и КТ отмечено увеличение показателей перфузии конечностей, дистанции безболевого ходьбы и числа видимых коллатералей, повышение уровня физической активности по данным опросника. Серьезных осложнений зарегистрировано не было. Исходный уровень ЦКП значительно

снижен у всех больных. Процедуры ГТ и КТ сопровождались достоверным повышением уровня ЦКП, более выраженным в группе КТ, которое сохраняется не менее 3 месяцев после лечения и коррелирует с уровнем перфузии конечности.

Влияние аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на чувствительность лейкемических клеток к противолейкемическим препаратам *in vitro*

Татарина О.С., Осипова Е.Ю. Румянцев С.А.

Лаборатория регуляции кроветворения отдела молекулярной и экспериментальной гематологии, онкологии и иммунологии ФНКЦ ДГОИ Росздрава

Введение: Метод трансплантации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из костного мозга доноров используется в клинической практике для ускорения приживления кроветворных предшественников и для профилактики и терапии иммунологических осложнений аллогенной трансплантации гемопоэтических клеток-предшественников, которая чаще всего применяется для лечения злокачественных гематологических заболеваний: острых и хронических лейкозов. Согласно данным литературы, МСК различных культуральных линий могут снижать чувствительность лейкозных клеток к химиотерапии *in vitro*, которая является важным прогностическим фактором при лечении больных лейкозами.

Цель исследования: определение влияния аллогенных мезенхимальных стволовых клеток доноров на чувствительность лейкозных клеток пациентов к противолейкемическим препаратам *in vitro*.

Материалы: 1) Лейкемические клетки, выделенные из костного мозга пациентов детского возраста с острыми лейкозами, в соответствии с диагнозом разделенные на 3 группы. 2) Мезенхимальные стволовые клетки из костного мозга здоровых доноров.

Методы: МТТ-анализ по методике лаборатории онкогематологии и иммунологии госпиталя Свободного Университета Амстердама с модификациями. В ходе эксперимента производили инкубацию лейкозных клеток костного мозга с химиопрепаратами: цитарабином, даунорубицином и метилпреднизолоном в различных разведениях, — на подложке из МСК и без подложки из МСК. В последующем рассчитывали полулетальную концентрацию для каждого препарата. Между чувствительностью лей-

козных клеток к химиопрепаратам и полулетальной концентрацией этих препаратов существует обратно пропорциональная зависимость. Помимо этого, производилась оценка выживаемости лейкозных клеток, культивируемых с МСК без добавления препаратов, выживаемость измерялась в процентах.

Результаты: имелась тенденция к снижению чувствительности В-лейкозных клеток и миелоидных клеток под действием МСК к цитарабину и даунорубину, повышению чувствительности В-лейкозных клеток и снижению чувствительности миелоидных клеток к метилпреднизолону под действием МСК. Выживаемость всех групп лейкозных клеток под действием МСК повышалась.

Заключение: мезенхимальные стволовые клетки способны оказывать влияние на чувствительность лейкозных клеток к противолейкемическим препаратам и повышать выживаемость лейкозных клеток.

Локализация пероксида водорода в клетке при активации тирозинкиназных рецепторов

Тюрин-Кузьмин П.А.¹, Сафронова Н.М.²,
Воротников А.В.¹, Белоусов В.В.²

¹ *Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова*
² *Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва*

Ростовые факторы EGF и PDGF регулируют деление мезенхимальных клеток-предшественников из жировой ткани. Пероксид водорода (H_2O_2) играет ключевую роль во внутриклеточном проведении сигнала от тирозинкиназных рецепторов (RTK), в том числе EGFR и PDGFR. Мы исследовали механизм образования и внутриклеточную локализацию H_2O_2 при стимуляции RTK. Для этого мы использовали ЗТЗ фибробласты, экспрессирующие преимущественно PDGFR, и эпителиальные клетки HeLa, содержащие преимущественно EGFR.

Целью нашей работы было изучение внутриклеточной локализации и диффузии H_2O_2 , синтезируемого NADPH оксидазой при стимуляции RTK в модельных системах для PDGFR (фибробласты ЗТЗ) и EGFR (эпителиальные клетки HeLa). Мы изготовили набор вариантов биосенсора NupEr, имеющих различную внутриклеточную локализацию. Генетически-кодируемый

биосенсор HuPer обладает высокой чувствительностью и специфичностью к H_2O_2 , изменяя спектр возбуждения флуоресценции при взаимодействии с последним. Полученные варианты биосенсора мы экспрессировали в клетках и наблюдали за изменением их спектральных характеристик с помощью флуоресцентной микроскопии в реальном времени. Изменения уровня H_2O_2 рассчитывали по соотношению пиков спектра возбуждения флуоресценции биосенсора, которое не зависит от уровня экспрессии биосенсора.

Мы обнаружили, что при стимуляции эпителиальных клеток EGF H_2O_2 синтезируется NADPH оксидазой, которая расположена в клатриновых эндосомах, содержащих интернализированный EGFR. Около плазматической мембраны уровень H_2O_2 практически не изменяется, что свидетельствует о том, что H_2O_2 в клетке выделяется локально и не распространяется по всей цитоплазме. Напротив, в фибробластах, после их стимуляции PDGF, H_2O_2 синтезируется, в основном, вблизи плазматической мембраны. В обоих случаях H_2O_2 продуцируется также на мембране эндоплазматического ретикулула.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что при стимуляции RTK ростовыми факторами H_2O_2 продуцируется и действует локально в отдельных компартментах клетки. Диффузия H_2O_2 между компартментами клетки ограничена. Использование разработанных биосенсоров удобно для изучения динамики сигнальных каскадов в одиночных клетках гетерогенных культур клеток-предшественников.

Влияние генерации активных форм кислорода в мезенхимных стромальных клетках на состояние митохондрий и лизосом

Ударцева О.О., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б.

*Учреждение РАН государственный научный центр Институт
медико-биологических проблем, Москва*

Ранее мы показали, что культивирование мезенхимных стромальных клеток (МСК) в среде с пониженным содержанием O_2 приводит к повышению уровня активных форм кислорода (АФК). Известно, что высокие концентрации АФК обладают цитотоксическим действием. В настоящей работе мы исследовали влияние повышения уровня АФК, индуцированного фотодинамическим воздействием (ФДВ), на состояние митохондрий и лизосом МСК, культивируемых при различном содержании O_2 в среде.

МСК жировой ткани человека 2–6 пассажей культивировали по стандартному протоколу в условиях 20 % и 5 % O_2 . Через 24 после добавления

Фотосенса® (ФС®) (сульфонированный фталоцианин алюминия (ГУП НИОПИК РФ)), 10 мкг/мл, клетки промывали и облучали с помощью лазерного аппарата АЗОР ($\lambda = 675$ нм) дозами 1–2 Дж/см². Сразу после облучения в среду культивирования добавляли мито- (500 нм) или лизо- (100 нм) трекеры на 1 час, а затем анализировали клетки на поточном цитофлуориметре.

Мы показали, что при культивировании в среде с пониженным содержанием O₂ увеличивалось количество активных митохондрий в клетках. В этих же условиях уменьшалось количество МСК, содержащих активные лизосомы. После добавления ФС® в среду культивирования нормоксических и гипоксических МСК возрастала как доля окрашенных лизотрекером МСК, так и интенсивность их окрашивания, что свидетельствовало о закислении лизосомального компартмента клеток, т. е. об активации лизосом. После ФДВ было выявлено уменьшение доли клеток, содержащих лизо- и митотрекеры, и уменьшение интенсивности флуоресценции зондов в них.

Таким образом, генерация АФК при ФДВ вызывает снижение трансмембранного потенциала митохондрий, тогда как повышение уровня АФК при пониженном содержании O₂ не изменяет их функционального статуса.

Работа выполнена при поддержке Госконтракта Миннауки № 02.518.11.7141.

Allogeneic transplantation of chorionic stem-progenitor cells at normothermic reperfusion of kidney received from non-heart beating rats

Alexander N. Kharlamov¹, Ciryil Moers, Jan L. Gbainsky¹

Department of surgery, University Medical Center Groningen, Groningen, The Netherlands; ¹Urals State Medical Academy, Yekaterinburg, Russia

Background. An increase of the non heart beating donors is one of the main strategies of the donorpool expansion. The key problem is a certain inevitability of the allograft ischemic and reperfusion damage. We designed this research for experimental searching of the new preservation and perfusion models.

Methods. A total of 60 rats (Lewis) were assigned to the group with using of chorionic stem-progenitor cells (CSPS) in the composition of UW-solution and perfluorinecarbon emulsion (30 rats), and to the control group (without CSPS, 30 rats). The primary outcome is a histological degree of graft delayed function, and chronic allograft nephropathy.

Results. Delayed graft function was revealed in 2 (9.1%) CSPS rats, and 7

(35%) controls. Beyond one year, a later phase of chronic allograft nephropathy (59% in CSPS rats as compared with 90% of control) was characterized by microvascular and glomerular injury ($p < 0.001$ for both comparisons). Progressive high-grade arteriolar hyalinosis with luminal narrowing, increasing glomerulosclerosis, and additional tubulointerstitial damage that was achieved at one year in 40.9% of CSPS rats as compared with 75% of control ($p < 0.001$). Serum creatinine was 1.8 mg/dl at the beginning of research and was detected as 3.5 mg/dl at one year in control as compared 2.4 mg/dl in CSPS rats. Urine production was much more higher (on 35%, $p < 0.005$) in CSPS rats at the finish. Protein concentration was changed from 5.8 mg/ml to 12.4 mg/ml in control, and to 8.7 mg/ml in CSPS rats. The difference between histological damage (by Banff score) at one year was 28% ($p < 0.001$). Unfortunately at second year the advantage of SC's technology was just 5% ($p < 0.001$ for both comparisons). Transplanted CSPS had a suppressed influence over activity and migration of the host mesenchymal SCs. There were CSPS as cells-regulators affecting for activity and migration of host local kidney stem cells. Autoimmune response (TGF beta-1, IL-6, IL-17) was depressed at one year (minus 62%, $p < 0.001$) and was increased at second year (more than 67%, $p < 0.001$).

Conclusions. The using of CSPS is effective for prevention of graft delayed function, and a decrease of chronic allograft nephropathy degree that is increasing viability of the graft. Used technique leads to decreasing of calcineurin-inhibitor nephrotoxicity. Transplanted SC's inhibited activity and migration of bone-marrow stem cells. The great problem is an autoimmune and protooncogenic response for SC's transplantation.

Key words: kidney transplantation, chorionic stem-progenitor cells, non heart beating donors.

Характер встраивания эмбриональных стволовых клеток после микроинъекции в развитии зародышей мыши *in vitro*

Храмцова Е.А., Капралова И.В.

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская область
e-mail: hramelan@gmail.com*

Для получения трансгенных животных широко применяют микроинъекцию эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), несущих чужеродную генетическую информацию. Для исследования характера встраивания модифицированных клеток в ткани зародыша и их дальнейшей дифференцировки

используют ЭСК с экспрессией GFP белка. Также, представляет интерес вопрос об изменении экспрессии гена *gfr* в раннем развитии зародышей *in vitro* после микроинъекции стволовых и соматических клеток. В работе использовали клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) из бластоцист мыши линии C57Bl/6TgN (FGP) с экспрессией гена *gfr*, и первичные эмбриональные фибробласты (ПЭФ) зародышей той же линии. Также, использовали эпителиальные клетки Cos-1, трансфицированные геном *gfp*. Предварительно для микроинъекции под флуоресцентным микроскопом отбирали светящиеся клетки, несущие белок GFP. Все клетки вводили в бластоцисты мыши линии MNRI, в количестве по 7–10 клеток ВКМ и ПЭФ и по 3–5 клеток Cos-1, после чего бластоцисты культивировали в стандартных условиях в течение 72 часов.

С помощью конфокальной сканирующей микроскопии было показано, что клетки Cos-1 и ПЭФ, экспрессирующие флуоресцентный белок, через 24 ч и 48 часов после микроинъекции обнаруживались в области трофобласта. Также после 48 ч культивирования, клетки зародыша выходили из *z. pellusida* и формировали колонии эмбриональных стволовых клеток. Светящиеся клетки ПЭФ и Cos-1 также обнаруживались среди клеток трофобласта, при этом наблюдалось значительное снижение интенсивности флуоресценции GFP и полное исчезновение свечения через 72 ч культивирования в двух линиях клеток.

Клетки ВКМ с постоянной экспрессией FGP после микроинъекции в бластоцисты встраивались в зародыш случайным образом, как в клетки трофобласта, так и во внутреннюю клеточную массу. Свечение GFP уменьшалось или полностью исчезало в области ВКМ уже через 48 ч культивирования, тогда как свечение клеток в области трофобласта было более интенсивным.

Система ко-культивирования мезенхимальных стволовых клеток и клеток нейробластомы SH-SY5Y: новая модель *in vitro* для скрининга биологической активности веществ

Шафигуллина А.К.¹, Блат Н.Л.², Ризванов А.А.^{1,2}

¹ *Казанский государственный медицинский университет,*

² *Казанский государственный университет*

В биомедицине остро стоит проблема изучения этиологии и патогенеза рака, процессов малигнизации и метастазирования, создания клеточных систем *in vitro* для доклинического тестирования противораковых препара-

тов. Широко применяемая в настоящее время система скрининга противораковых препаратов, разработанная в 1985 году в Национальном Институте Рака, США, несмотря на свою техническую простоту, не позволяет точно моделировать биологические процессы в контексте сложной трехмерной структуры опухолей и взаимодействия раковых клеток с их микроокружением. В результате этого наблюдается низкая корреляция результатов скрининга противораковых препаратов *in vitro* и *in vivo*. Существует несколько альтернативных тест-систем (раздельные ко-культуры, органотипические и сфероидные культуры, и т. п.), они также имеют ряд недостатков. Сложность заключается в моделировании межклеточных взаимодействий и упрощении анализа компонентов тест-системы.

Для решения этой проблемы нами было проведено ко-культивирование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и клеток нейробластомы SH-SY5Y человека на различных биологических субстратах. Каждая клеточная популяция была мечена специфичным витальным флюоресцентным красителем, что позволило проводить анализ ко-культуры в реальном времени с помощью флюоресцентной микроскопии и проточной цитометрии. Ко-культивировании клеток на поли-L-лизине, фибронектине, желатине, коллагене и немодифицированном культуральном пластике приводило к спонтанной самоорганизации клеток — «островки» раковых клеток окруженные «протоками» фибробласто-подобных МСК — напоминающей гистологический срез метастатических очагов. При культивировании на поверхности, покрытой слоем Матригеля, наблюдалось формирование плотного сгустка МСК, окруженного «ореолом» клеток SH-SY5Y. Ко-культивирование клеток на немодифицированном культуральном пластике привело к повышению жизнеспособности раковых клеток в 2 раза по сравнению с чистой культурой SH-SY5Y в условиях окислительного стресса, что согласно литературным данным наблюдается в экспериментах *in vivo*. Разработанная клеточная тест-система является новым подходом в моделировании межклеточных взаимодействий, позволяет проводить анализ каждого из клеточных компонентов в реальном времени, демонстрирует качественное изменение свойств раковых клеток в ко-культуре и служит основой для разработки эффективной доклинической модели скрининга препаратов для практического здравоохранения.

Мезенхимальные стволовые клетки пуповинной крови и костного мозга человека как источник «нейросфер» при нейрогенной индукции

Шахбазов А.В.¹, Петевка Н. В.², Космачева С.М.², Картель Н.А.¹,
Потапнев М.П.²

¹ *Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*
E-mail: shakhbazau@gmail.com

² *РНПЦ гематологии и трансфузиологии, Минск, Беларусь*

Для стволовых клеток нервной ткани, а также индуцированных в нейрональном направлении других типов стволовых клеток (в частности, эмбриональных), характерным этапом является формирование флотирующих сферических агрегатов клеток, получивших название «нейросфер». При дальнейшем высеве на соответствующие субстраты клетки, составляющие нейросферы, дают начало нейрональному и олигодендроглиальному направлениям дифференцировки. Подобные клеточные агрегаты, несущие характерные для нейросфер микроотростки, были получены нами при культивировании МСК костного мозга и пуповинной крови в нейрогенной среде NeuroCult с добавлением 20 нг/мл EGF и 10 нг/мл FGFb в низкоадгезивных условиях на 2–4 день. При этом, МСК пуповинной крови характеризовались существенно более быстрым образованием нейросфер, их большим количеством (до 260 сфер на 10000 высаженных клеток) и размерами. Количество нейросфер из МСК костного мозга существенно варьировало в зависимости от донора и, как правило, не превышало 5–7 на 10000 высаженных клеток на 7-й день дифференцировки. Как для костного мозга, так и для пуповинной крови было характерно резкое падение способности генерировать нейросферы по мере пассирования. При дальнейшем высеве нейросфер часть клеток приобретала нейроноподобный фенотип и экспрессировала ряд ранних нейрональных маркеров (нестин, NSE, β -III-тубулин). Разработка и внедрение методов нейрогенной дифференцировки МСК может существенно расширить потенциал клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний и травм нервной системы.

Создание клеточного продукта на основе клеток кожи человека - кератиноцитов и биodeградируемой полимерной плёнки

Швед Ю.А.^{1,2}, Блинова М.И.¹, Билибин А.Ю.², Пинаев Г.П.¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербурге
Санкт-Петербургский государственный университет,
химический факультет*

Проблема восстановления повреждённых органов и тканей является перспективным направлением современной регенеративной медицины. Одним из приоритетных направлений регенеративной медицины является восстановление структурной целостности кожных покровов, повреждённых в результате ожогов, трофических язв и воздействий другого рода. Для этой цели выращенный *in vitro* клеточный пласт эпителиальных клеток — кератиноцитов должен быть перенесён на поражённый участок кожи. Однако для отделения клеточного пласта от поверхности культурального сосуда, необходима обработка протеолитическими ферментами. Такая обработка приводит к частичному повреждению рецепторов, находящихся на поверхности клеток. Полимерные матрицы, позволяющие культивировать на них кератиноциты человека с образованием многослойного клеточного пласта, при совместном переносе их в область повреждения позволят исключить процедуру обработки клеток, выращиваемых по известным технологиям, протеолитическими ферментами и ускорить процесс заживления ран.

Цель исследования — разработка биodeградируемой полимерной матрицы, предназначенной для культивирования клеток кожи человека с целью их трансплантации на повреждённый участок кожи.

В процессе исследования были решены следующие задачи: отработаны условия формирования полимерных плёнок для свободного доступа к клеткам питательных веществ и отвода продуктов метаболизма и определена скорость их деградации в условиях культивирования клеток и после имплантации в организм лабораторных животных. Разработаны методы модификации поверхности полимерных плёнок и подобраны оптимальные условия для культивирования клеток кожи на этих плёнках.

Генетически модифицированные стромальные клетки жировой ткани, секретирующие VEGF, стимулируют ангиогенез *in vivo*

Шевченко Е.К., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Парфёнова Е.В.

Федеральное государственное учреждение Российский кардиологический научно-производственный комплекс Росмедтехнологий

Введение. Наиболее перспективное направление в клеточной трансплантологии — использование генетически модифицированных клеток — своеобразный альянс клеточной и генной терапии. Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) благодаря возможности выделения их в большом количестве у пациентов при минимальном хирургическом вмешательстве, а также высокому уровню экспрессии ими различных митогенных, анти-апоптотических и ангиогенных факторов могут стать важнейшим инструментом клеточной терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В данной работе мы изучали возможность использования СКЖТ для доставки гена человеческого фактора роста сосудистого эндотелия, VEGF, с целью стимуляции ангиогенеза.

Материалы и методы. Для генетической модификации клеток использовали непатогенный для человека рекомбинантный аденоассоциированный вирус (рекААВ) серотипа 2 (Stratagene). СКЖТ человека выделяли из жировой ткани доноров, взятой при хирургической операции. Клетки на ранних пассажах трансдуцировали рекААВ, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP), либо VEGF. Эффективность трансдукции клеток определяли микроскопическим анализом и методом проточной цитофлуориметрии. Уровень экспрессии трансгена анализировали с помощью иммуноферментного анализа и иммуноблоттинга. Для того, чтобы определить эффект секреции VEGF модифицированными СКЖТ на прорастание сосудов, использовали модель подкожной имплантации матригеля иммунодефицитным мышам.

Результаты. С помощью проточной цитофлуориметрии определили наличие в популяции СКЖТ клеток, которые несут на своей поверхности гепарансульфат протеогликан, рецептор, через который происходит связывание вируса с клеткой. Было показано, что 55-65% популяции СКЖТ экспрессируют данный белок. Эффективность трансдукции СКЖТ рекомбинантным вирусом, выраженная в процентном содержании флуоресцирующих, GFP-позитивных, клеток, составила 60+/-7%. Флуоресценцию GFP наблюдали, в течение месяца. Клетки, трансдуцированные вирусом с VEGF, секретируют в 30 раз большее количество белка по сравнению

с немодифицированными клетками. Кроме того, VEGF-секретирующие СКЖТ стимулировали прорастание сосудов и значительно увеличивали васкуляризацию матригеля у иммунодефицитных мышей.

Таким образом, показана возможность использования рекомбинантно-го аденоассоциированного вируса человека для доставки терапевтического гена в стромальные клетки жировой ткани человека. Генетически модифицированные СКЖТ, секретирующие VEGF, значительно лучше стимулируют ангиогенез по сравнению с немодифицированными клетками.

Появление маркеров первичных половых клеток в эмбриональных стволовых клетках человека культивируемых в среде обогащенной факторами дифференцировки в условиях отсутствия фидера и сыворотки

Шейна Ю.И., Еремеев А.В.

Красноярский государственный медицинский университет

Недавние работы показали возможность получения половых клеток из эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) различных животных и человека. Это дает предпосылки к разработке новейших методов лечения бесплодия связанного с нарушениями гаметогенеза. Для направленной дифференцировки ЭСК в половые необходимо понимание процессов, протекающих на различных стадиях образования гамет. С связи с этим необходима разработка методов получения первичных половых клеток (ППК) в культуральных средах без компонентов животного происхождения. Целью настоящей работы было исследование динамики экспрессии маркеров первичных половых клеток в ЭСК человека при их культивировании в среде обогащенной факторами дифференцировки в условиях отсутствия фидерных клеток и сыворотки.

ЭСК человека 49-ой линии культивировались в среде обогащенной морфогенетическим белком 4 (BMP4), эпидермальным фактором роста (EGF), ретиноевой кислотой, фолликулостимулирующим и лютеинизирующим гормонами. Культивирование клеток проводилось в течение четырех недель. Для идентификации прохождения клетками стадий дифференцировки, каждые 3 дня осуществлялся забор клеток для проведения обратной транскрипции и ПЦР для анализа экспрессии следующих маркеров: Oct4, *ifitm*³, DPPA3, DDX4, ZP3.

В ходе исследования было показано, что OCT4 стабильно экспрессируется до третьей недели культивирования, и затем постепенно исчезает к концу срока проведения эксперимента. Ген DPPA3 интенсивно экспрессировался со второй недели культивирования, и постепенно уровень экспрессии снижался к третьей недели. IFITM3 стабильно присутствует во всех клетках в ходе дифференцировки. DDX4 и ZP3 в ходе эксперимента не экспрессировались. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в ходе дифференцировки ЭСК человека вступали в начальную стадию образования ППК, но затем из-за нестабильных условий изменяли ход дифференцировки.

Создание линий iPS клеток (стволовых клеток с индуцированной плюрипотентью) из эндотелиальных клеток человека

Шутова М.В.¹, Лагарькова М.А.¹, Честков И.В.¹, Богомазова А.Н.¹,
Ризванов А.А.², Киселев С.Л.¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН

²Казанский государственный медицинский университет

Индукцированные плюрипотентные клетки (iPS) впервые были получены и охарактеризованы японским исследователем Яманака в 2006 году (Takahashi & Yamanaka, 2006). Он предложил использовать этот термин для клеток, полученных в результате индукции соматических клеток в плюрипотентное состояние путем их генетической модификации. В настоящее время iPS клетки получены из многих клеток мыши, однако для человека эффективное репрограммирование было проведено только на трех типах клеток: фибробластах кожи, кератиноцитах, и клетках крови. Таким образом, в задачи исследования входило создать методику получения iPS клеток из клеток эндотелия человека. В нашей работе была использована первичная культура клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVEC). Мы выбрали для репрограммирования эндотелиальные клетки из-за их легкой доступности, максимально неизмененного генома (нарушения могут происходить из-за длительного культивирования и воздействий кружающей среды *in vivo*), и отсутствия необходимости проводить специальную селекцию полученных iPS клонов. В клетки HUVEC с помощью лентивирусной системы доставки были введены четыре гена транскрипционных факторов: Klf4, Sox2, Oct3/4, c-Myc. Эти гены используются в большинстве исследований по индукции соматических клеток в плюрипотентное состояние.

На пятый день после инфекции клетки пересевались, на шестой среда менялась на среду для эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) человека. На 16 день появлялись первые колонии, на 20–25 день они пересевались и проводился морфологический, молекулярно-генетический и функциональный анализ. В результате экспериментальной работы было отобрано 9 независимых клонов. Они были охарактеризованы методами ОТ-ПЦР анализа, анализа кариотипа и иммуноцитохимического анализа. Анализы показали, что во всех клонах начался процесс репрограммирования. Полученные клоны были способны образовывать эмбрионные тельца и дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков, что подтверждает их плюрипотентный статус. В результате нашей работы из клеток HUVES были получены независимые линии iPS клеток.

Особенности мезенхимальных клеток жировой ткани при вторичной лимфедеме

Янкайте Е.В., Повещенко О.В., Ким И.И., Ульянов Е.В., Нимаев В.В., Шумков О.А., Коненков В.И.

ГУ НИИ Клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН, Новосибирск

Жировая ткань является источником мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Целью настоящей работы явилась разработка эффективной методики забора и метода культивирования МСК жировой ткани, характеристика полученных клеток и сравнительный анализ полученных данных в норме и при вторичной лимфедеме.

В результате исследования было выяснено, что наиболее эффективным методом забора жировой ткани, как при лимфедеме, так и в норме, является липоаспирация (липосакция). Установлено, что количество выделенных МСК в норме составляет $0,4 - 0,5 \times 10^6$ клеток из 1 мл жира в ранние сроки и $0,2 - 0,3 \times 10^6$ клеток через 18 часов после липоаспирации, при лимфедеме — на 10 % больше. Оптимальной плотностью клеток при культивировании является $0,5 \times 10^3 / \text{см}^2$. Динамика роста клеток, выделенных из жира при вторичной лимфедеме, несколько превышает динамику роста клеток нормальной жировой ткани.

Сроки образования субконфлюентного слоя в норме и при лимфедеме 9–11 суток при 0 пассаже, 6–8 суток при 2–3 пассажах. На ранних пас-

сажах преобладают мелкие клетки, к 5 пассажу культуры представлены гомогенной популяцией одноядерных фибробластоподобных веретенчатых клеток, иногда с небольшим количеством отростков. При лимфедеме размеры клеток крупнее, а количество отростков больше.

Большинство выделенных из нормальной жировой ткани и при лимфедеме клеток имеют фенотип CD73⁺CD90⁺CD3⁻CD14⁻CD19⁻CD45⁻. Также выявлена экспрессия в свежевыделенных клетках фенотипического маркера гемопоэтических стволовых клеток CD34.

Таким образом, жировая ткань является доступным в плане забора и выделения источником МСК для тканевой регенерации и репарации.

Функциональная характеристика мононуклеарных клеток периферической крови после мобилизации гранулоцитарным ростовым фактором

Янкайте Е.В.*, Ким И.И.* , Повещенко О.В.* , Хабаров Д.В.* ,
Романов А.Б.** , Покушалов Е.А.** , Коненков В.И.*

**НИИ КЭЛ СО РАМН, Новосибирск, Россия*

*** ФГУ «НИИ патологии кровообращения им. ак. Е.Н Мешалкина
Федерального агентства по высокотехнологичной медицинской помощи», Новосибирск*

В последнее время развивается новое терапевтическое направление-имплантация стволовых клеток, позволяющее инициировать рост новых мышечных волокон и развитие неангиогенеза в участках повреждения миокарда. Альтернативным источником костному мозгу является периферическая кровь после мобилизации ростовыми факторами.

Целью нашего исследования явился фенотипический и функциональный анализ мононуклеарных клеток периферической крови после мобилизации G-CSF (Грасальва) стволовых клеток из костного мозга у больных ишемической болезнью сердца.

Проведенные исследования показали увеличение CD34⁺ стволовых клеток в сепарированной крови при мобилизации в среднем на 79 %. Количество маркеров иммунокомпетентных клеток (CD45⁺, CD14⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD16⁺) при фенотипировании значительно не менялось после мобилизации. Количество клеток в S/M фазах клеточного цикла составило около 10 % после мобилизации и 2 % до введения G-CSF. Мононуклеарные клетки имели высокую жизнеспособность (99 %), низ-

кую апоптотическую активность (2 % при определении клеточного цикла и менее 1 % CD95+ клеток), активно реагировали на стимуляцию митогеном (МТТ-тест). Определение количества цитокинов в супернатантах мононуклеарных клеток на уровне спонтанной продукции выявило достаточно большой спектр из различных функционально значимых групп, а при митогенной стимуляции конканавалином А показало значимый прирост цитокинов (ФНО- α , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИФН- γ , ГМ-КСФ).

Таким образом, периферическая кровь после мобилизации является эффективным источником для клеточной трансплантации.

