

Министерство образования и науки РФ
Российский фонд фундаментальных исследований
Российская академия наук
Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

«Стволовые клетки и регенеративная медицина»

Всероссийская научная школа-конференция

25–28 октября 2010 г.

г. Москва

СОДЕРЖАНИЕ

Культивирование <i>in vitro</i> мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы в присутствии плазмы крови усиливает их способность дифференцироваться в адипогенном направлении. Александрова С. А.	7
Стратегии фундаментальных исследований в области регенеративной клеточной медицины заболеваний ЦНС. Александрова М.А.	8
Стимуляция ангиогенеза и репарации миокарда при трансплантации мононуклеаров красного костного мозга у крыс. Байкова Ю.П.	9
Особенности процесса атрезии овариальных фолликулов у европейской рыжей полевки в условиях естественных геохимических аномалий. Байтмирова Е. А.	10
Выделение и характеристика клеток-прогениторов сетчатки человека. Баранов П.Ю	11
Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных методом трансдукции ретровирусами, несущими гены поддержания плюрипотентного состояния. Бернвальд В.В.	13
Адгезивность аллокератиноцитов к хитозановым матриксам. Бузинова Д.А.	14
Остеорегенерация при трансплантации тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и полилактидных носителей. Бухарова Т.Б.	15
Коррекция неврологического дефицита в модели нарушений венозного кровотока головного мозга при трансплантации мезенхимальных стромальных клеток. Васильев И.А.	16
Элиминация нейроспецифических белков в ликвор и кровь после введения в большую цистерну мозга алогенных клеток эмбриональной нервной ткани крысам с ишемическим инсультом. Волков А.И.	17
Экспрессия мРНК BDNF в параинфарктной зоне после имплантации нейрогенных стволовых клеток крысам с инсультом в сенсомоторной коре. Волков А.И.	19
Динамика концентрации ростовых факторов в крови крыс при интрамиокардиальном введении мезенхимальных клеток в условиях постинфарктного кардиосклероза. Головкин А.С.	20
Формирование сфероидов из стромальных клеток жировой ткани при 3D культивировании. Горкун А.А.	22
Исследование механизмов активации мезенхимальных клеток жировой ткани в ответ на воспалительное окружение. Григорьева О.А.	23
Возможности аутологичной клеточной терапии ишемической сердечной недостаточности. Гульева Н.А.	24

Характеристика c-kit позитивных клеток в миокарде больных ишемической болезнью сердца. Дергилев К. В.	25
Изменение функциональных свойств мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при старении. Ефименко А.Ю	26
Влияние провоспалительного цитокина интерлейкина-17 на экспрессионный профиль мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани. Иванова Д.П.	28
Мезенхимальные клетки жировой ткани стимулируют восстановление общего малоберцового нерва мыши после травмы. Карагяур М.Н.	29
Подкожные имплантации нейральных стволовых клеток способствуют восстановлению когнитивных функций у крыс с моделированием минимальных мозговых дисфункций. Карасёв А.В.	30
Применение красителя CFDA-SE для визуализации имплантированных клеток. Карасёв А.В.	31
Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий для лечения ран при локальной ишемии нижних конечностей. Кауламбаева М.З	32
Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий для профилактики несостоятельности легочных швов. Кауламбаева М.З.	33
Стратегия построения тканеинженерных конструкций кожи на раневой поверхности <i>in vivo</i> . Ковалев А.В.	35
Ко-культивирование стволовых клеток и целевой культуры приводит к её замещению потомками стволовых клеток, дифференцированных в клеточный тип целевой культуры. Ковина М.	37
Аутологичная система бесфидерного культивирования эмбриональных стволовых клеток человека. Кольцова А. М.	38
Трансплантация генетически модифицированных скелетных миобластов при экспериментальной терапии инфаркта миокарда у крыс. Конопляников М.А.	40
Использование радиоактивно меченных мезенхимальных стволовых клеток для целей радиоизотопной диагностики. Конопляников А.Г.	41
Влияние клотримазола на пролиферацию фибробластоподобных стромальных клеток жировой ткани крыс, индуцированную основным фактором роста фибробластов. Кремено С.В.	43
Создание трансплантатов костной ткани <i>in vitro</i> , на основе синтетического матрикса и клеточного материала. Кульнева Е.И.	44
Является ли обязательным присутствие в паренхиме головного мозга терапевтических НСК для проявления их нейротропного действия? Лебедев С.В.	45
Получение и анализ индуцированных плюрипотентных стволовых (иПС) клеток крысы. Лисковых М.	46
Использование комбинаций плазмидных векторов для терапевтического ангиогенеза: исследование на мышинной модели ишемии. Макаревич П.И.	48

Фенотипическая пластичность клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека <i>in vitro</i>. Милюшина Л.А.	49
Трансплантация костного мозга как способ лечения моногенных заболеваний на примере миодистрофии мышей <i>mdx</i>. Михайлов В.М.	50
Посттравматическая регенерация спинного мозга крысы при введении в область повреждения вектора <i>pBud-VEGF+FGF2</i>. Мухамедшина Я.О.	51
Разработка условий культивирования клеток дермальной папиллы. Мягкова Е.П.	52
Метод органотипического культивирования <i>in vitro</i> тканей глаза позвоночных животных как способ активации клеточных источников регенерации сетчатки глаза. Новикова Ю.П.	53
Новый участник <i>JAK/STAT</i> пути коактиватор транскрипции <i>SAYP/PHF10</i> важен для поддержания плюрипотентного статуса стволовых клеток. Панов В.В.	55
Модифицирующие эффекты мезенхимальных стволовых клеток на продукцию макрофагами активных форм кислорода в аллогенной и ксеногенной системах сокультур. Петров В.Н.	56
Опыт работы низкотемпературного банка аутологических и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине. Прокопюк В.Ю.	58
Устойчивость кератиноцитов к низким температурам в условиях <i>in vitro</i>. Райдан М.М.	60
Влияние мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на воспалительный ответ при пиелонефрите. Рогачева Н.В.	61
Роль эпидермального фактора роста в поддержании жизнеспособности заднего эпителия роговицы при консервации. Розина В.Н.	62
Фармакологическая защита трансплантата роговицы гомологичными клеточными пептидами на этапе нормотермической и гипотермической консервации. Ролик О.И.	63
Культивирование сперматогенных клеток хряка на фидерном слое в присутствии <i>LIF/DIA</i>. Савченкова И.П.	64
Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза. Салафутдинов И.И.	65
Разработка клеточного продукта с использованием стромальных клеток костного мозга для восстановления хряща в зоне роста трубчатых костей. Сахенберг Е.И.	66
Испытание тканеинженерного биодеградирующего графта в качестве протеза кровеносного сосуда <i>in vivo</i>. Севостьянова В.В.	67
Поведение трансплантированных стволовых клеток в составе органотипической эксплантационной культуры сетчатки глаза. Сергеев С.А.	69

Дифференцировка регенерация скелетных мышц мышей mdx после трансплантации стволовых клеток костного мозга. Соколова А.В.	70
Проблема безопасности и обоснованности риска пациента в регенеративной медицине в системе обязательного медицинского страхования. Старченко А.А.	71
Цитофенотип клеточного препарата, использующегося для терапии поражений эндотелия роговицы. Суббот А.М.	74
Взаимодействие клеток мезенхимального происхождения и аллогенных иммунокомпетентных клеток человека в экспериментах <i>in vitro</i> . Суздальцева Ю.Г.	76
Предифференцированные мезенхимальные фибробластоподобные стволовые клетки из жировой ткани человека для тканеинженерной конструкции хрящевой ткани. Сургученко В.А.	78
Использование стволовых клеток костного мозга для направленного транспорта лекарственных веществ. Темнов А.А.	79
Генетическая сенсбилизация как новый подход в подавлении туморогенности плюрипотентных стволовых клеток. Томилин А.	80
Пространственно-временная динамика выделения H ₂ O ₂ в клетках-предшественниках. Тюрин-Кузьмин П.А.	81
Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток лимбальной зоны донорского глаза человека . Тонаева Х.Д.	82
Анализ результатов трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у 180 больных рассеянным склерозом. Федоренко Д.А.	83
Получение инсулин-продуцирующих клеток из различных популяций мультипотентных стромальных клеток (МСК) жировой ткани и пупочного канатика человека. Федюнина И. А.	84
Трансплантация стволовых клеток при травме сетчатки. Ченцова Е.В.	85
Особенности коллагенового состава волокнистой матрицы для клонирования окончательной почки человека. Шаповалова Е. Ю.	87
Предварительные результаты конструирования биокератопротезного комплекса с использованием аутофибробластов кожи реципиента. Шипунова А.В.	88
Возможности оптимизации репаративного остеогенеза при трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на деминерализованном костном аллотрансплантате. Щепкина Е.А.	90
Оптимизация органо-типической перестройки distractionного регенерата при трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Щепкина Е.А.	91

Культивирование *in vitro* мезенхимных стволовых клеток костного мозга крысы в присутствии плазмы крови усиливает их способность дифференцироваться в адипогенном направлении

Александрова С. А.¹, Сковроньска М.², Старикова Э.А.¹, Пинаев Г. П.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4*

² *Санкт-Петербургский Государственный Политехнический Университет*

В настоящее время широко исследуются возможности технологий клеточной терапии с введением размноженных *in vitro* мезенхимных стволовых клеток (МСК) костного мозга в кровеносное русло или непосредственно в ткань. Для оценки терапевтических характеристик используемых стволовых клеток чрезвычайно важно выяснить какое влияние на них оказывает пребывание в плазме крови. С этой целью было проведено изучение динамики появления адипогенного фенотипа при стандартном протоколе адипогенной дифференцировки МСК и при предварительной инкубации МСК в присутствии плазмы крови.

Для исследования использовали МСК, выделенные из костного мозга нижних конечностей беспородных белых лабораторных крыс. МСК 2-го пассажа в концентрации 2×10^4 кл/см² высевали в питательную среду α МЕМ с 10 % и 50 % сыворотки эмбрионов коров или аллогенной плазмы, культивировали в течение 2 сут, после чего проводили индукцию адипогенной дифференцировки по стандартному протоколу с использованием дексаметазона. Обработку клеток индуцирующей средой осуществляли в течение двух недель, смену среды проводили каждые 3–4 сут культивирования. Состояние дифференцировки оценивали по появлению в клетках липидных капель. В результате выполненных экспериментов было показано, что предварительное культивирование МСК в среде с добавлением плазмы крови приводит к быстрому и активному накоплению липидов плазмы и эффективной дифференцировке в адипогенном направлении. Количество адипоцитоподобных клеток в этом случае также было значительно выше, чем в контроле.

Таким образом, пребывание МСК в условиях взаимодействия с плазмой крови является важным этапом в развитии их терапевтических функций, заключающееся в существенном повышении их дифференцировочного потенциала.

Стратегии фундаментальных исследований в области регенеративной клеточной медицины заболеваний ЦНС

Александрова М.А.

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

В настоящее время, по данным статистики, около 50 миллионов человек страдает от неизлечимых нейродегенеративных заболеваний нервной системы. Развитые страны вкладывают огромные средства в исследования, направленные на решение проблемы восстановления клеток мозга при нейродегенеративных процессах. Наиболее актуальные фундаментальные исследования направлены на разработку лекарственных препаратов нового поколения и терапевтического потенциала стволовых клеток (СК). Терапия на основе трансплантации экзо- и стимуляции эндогенных стволовых-прогениторных клеток направлена на активацию регенераторных процессов в мозге на молекулярном уровне и клеточное замещение. В основе влияния стволовых клеток лежит их способность экспрессировать широкий спектр активных молекул (факторы роста, нейротрофические факторы, интерлейкины, молекулы адгезии и др), которые необходимы для активации и поддержания восстановительных процессов в поврежденном мозге. Фундаментальной базой для этих разработок послужили интенсивные исследования в области нейральных стволовых клеток (НСК), которые открыли новые закономерности в ранних этапах развития мозга, в молекулярных процессах их пластичности и дифференцировки и возможности их генной трансформации.

В последние годы, исследования дифференцировки и пластичности других типов стволовых клеток (эмбриональных (ES) и тканеспецифических), а так же создание индуцированных плюрипотентных клеток (iPS) из соматических, повлекли за собой новую волну интереса к проблемам регуляции де- и трансдифференцировки клеток.

Суммируя эти фундаментальные исследования можно определить современные стратегии, которые используются для разработки в области регенеративной клеточной медицины нейродегенеративных заболеваний ЦНС. Подходы к клеточной терапии базируются на основе: аллогенных фетальных НСК; генно-модифицированных НСК; на аутологических СК нейрального генеза (например МСК); ES и iPS клетках; на ре- и трансдифференцировке клеток нейрального генеза и на стимуляции эндогенных НСК и клеток с подобными свойствами.

Какие именно клетки или их комбинация окажутся наиболее перспективными для терапии заболеваний ЦНС покажут будущие исследования.

Стимуляция ангиогенеза и репарации миокарда при трансплантации мононуклеаров красного костного мозга у крыс

Байкова Ю.П.¹, Фатхудинов Т.Х.^{1,3}, Большакова Г.Б.¹, Бухарова Т.Б.^{2,3}, Хохлова О.Н.⁴, Мурашев А.Н.⁴, Гольдштейн Д.В.^{2,3}

¹ НИИМЧ РАМН, Москва; ² МГНЦ РАМН, Москва; ³ ЗАО «Реметэкс», Москва; ⁴ ИБХ РАН, Москва.

Были изучены направления дифференцировки трансплантированных мононуклеарных клеток (МНК) красного костного мозга и их роль в стимуляции ангиогенеза и репаративных процессах миокарда. Для моделирования хронической сердечной недостаточности у крыс производили трансмуральный ОИМ с реперфузией. Через 30 сут. после ОИМ 5 млн. МНК, меченных PkH26, в 1 мл физраствора или только физраствор вводили трансвентрикулярным интракоронарным способом крысам CD в опытной (n=20) и контрольной (n=18) группах. Животных выводили из эксперимента через 14 и 30 суток. Было показано, что при неселективном интракоронарном введении меченые МНК мигрируют в основном в сердце и селезенку. Отсутствие флуоресцентной метки в кардиомиоцитах, эндотелиальных и гладкомышечных клетках кровеносных сосудов свидетельствует, что трансплантированные клетки не сливались и не дифференцировались в кардиомиоциты и клетки кровеносных сосудов. При этом меченые клетки локализовались только в рубце, имели фибробластоподобный фенотип, часть их окрашивалась АТ к маркеру реактивных фибробластов (Fα). Трансплантация клеток приводила к утолщению стенки сердца в области рубца, увеличению «клеточности» рубца и зрелости коллагеновых волокон рубцовой ткани, более выраженной гипертрофии перифокального миокарда, что обеспечивало укрепление стенки рубца и улучшение функции левого желудочка. Кроме того, наблюдали выраженную стимуляцию неоангиогенеза. Тем не менее не было выявлено уменьшения размера рубца и индекса дилатации левого желудочка. Учитывая локализацию и направление дифференцировки трансплантированных МНК, можно сделать вывод, что улучшение функции сердца происходит за счет укрепления рубца, гипертрофии перифокального миокарда и паракриных механизмов стимуляции репарации и ангиогенеза.

Исследование поддержано грантом Президента РФ МК-3395.2009.7.

Особенности процесса атрезии овариальных фолликулов у европейской рыжей полевки в условиях естественных геохимических аномалий

Е. А. Байtimiрова

Институт экологии растений и животных УрО РАН, 620144 г. Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

Изучены особенности овариального фолликулогенеза у рыжей полевки (*Myodes glareolus*: Rodentia) в условиях естественных геохимических аномалий, не вызывающих эндемических заболеваний. Показано, что у самок с аномальных участков возрастает доля атретических фолликулов на стадии перехода однослойных фолликулов в многослойные и полостные. Подобная закономерность свидетельствует о запуске процесса апоптоза в фолликулах и, как следствие, их атрезии, на более ранних стадиях роста. Самки контрольного участка, напротив, характеризуются более высокой степенью атрезии на стадии перехода вторичных фолликулов в третичные. В соответствии с представлениями о реципрокном взаимодействии различных компонентов приспособленности, энергетические затраты на процессы, связанные со стрессом, обусловленным действием тяжелых металлов в районах геохимических аномалий, должны быть компенсированы ограничением других потребностей, в частности связанных с воспроизводством. Вероятно, смещение акцента в сторону более раннего отбора развивающихся фолликулов, позволяет сократить затраты энергии в организме, связанные с их дальнейшим ростом. Вывод о компенсаторно-обусловленном увеличении гибели фолликулов на более ранних стадиях их роста в условиях аномалий согласуется с результатами изучения морфофункциональных особенностей коры надпочечника животных в данных районах. Проведенными ранее исследованиями показана гипертрофия пучково-сетчатой зоны надпочечника у животных аномального участка. Это свидетельствует о повышении неспецифической резистентности животных в экстремальных геохимических условиях. Таким образом, сокращение энергетических затрат на репродуктивные процессы в результате интенсификации атрезии на ранних сроках позволяет экономить достаточное количество энергии для протекания процессов приспособления к экстремальным геохимическим условиям.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ Урал проект № 10-04-96084.

Выделение и характеристика клеток-прогениторов сетчатки человека

Баранов П.Ю.^{1,2}, Суббот А.М.¹, Розина В.Н.¹, Федоров А.А.¹, Павлюк А.С.¹, Янг М.²

¹ НИИ глазных болезней РАМН, г. Москва 119021, г. Москва, ул. Россолимо, д. 11А и Б

² The Schepens Eye Research Institute, 20 Staniford Street, Boston, MA 02114, 617-912-0100

Актуальность. Восстановление дефектов сетчатки глаза является актуальной задачей клеточной биологии и регенеративной медицины. Сложность структуры ретины, многочисленные межклеточные контакты и разнообразие цитофенотипов требуют использования клеток-прогениторов, способных не только выживать и дифференцироваться после трансплантации, но и образовывать связи с сохраненными клетками. Имеющиеся экспериментальные данные подчеркивают наибольший потенциал фетальных клетки, выделенные из развивающейся сетчатки.

Цель. Выделить и охарактеризовать фетальные клетки-прогениторы сетчатки человека.

Материалы и методы. Проведен гистологический, морфометрический и иммунофлуоресцентный анализ сетчатки эмбрионов человека 14–20 недели гестации, подобраны оптимальные условия ферментативного выделения и культивирования клеток-прогениторов, охарактеризованы (ICC, Western Blot, RT-PCR, TRAPeze) полученные культуры на разных пассажах и их способность дифференцироваться в специализированные клетки сетчатки.

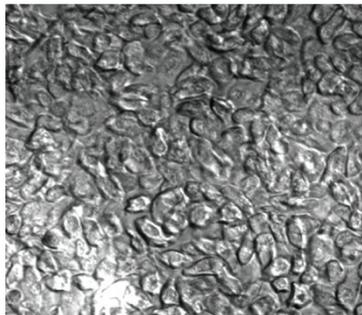


Рис. Культура аллокератиноцитов, выращенная на пленочном матриксе из хитозана.

Результаты. На 17–19 неделе гестации количество клеток существенно возрастает, они экспрессируют такие маркеры развития как Pax6, Sox2, появляются ресверип-позитивные клетки. При этом отсутствуют глиальные элементы, горизонтальные и амакринные клетки практически не представлены, межклеточные контакты развиты слабо, клетки наружного ядерного слоя не формируют выростов. Сравнение нескольких протоколов выделения показало, что наиболее щадящим является использование коллагена-

зы I при комнатной температуре — образующиеся кластеры (от 0,5 до 0,8 млн) и отдельные клетки (от 1,5 до 2 млн) высевали на покрытый фибронектином культуральный пластик. Формирующиеся культуры представляли из себя монослой треугольных и веретеновидных клеток с крупным ядром, экспрессирующих Sox2, Pax6, Otx2, hTERT, ABCG2, Ki67, CyclinD1. Полученные культуры пассировали до 20 раз, что сопровождалось уменьшением числа Sox2-позитивных, Ki67-позитивных и CyclinD1-позитивных клеток, уменьшением активности теломеразы. При добавлении в среду 5 % эмбриональной телячьей сыворотки клетки-прогениторы дифференцировались — начинали экспрессировать маркеры специализированных клеток сетчатки: GFAP, Opsin Red/Green, Opsin Blue, Calbindin, Rhodopsin, Photoreceptor Nuclear Marker, GS, Map2, mGluR6.

Заключение. Оптимальным для выделения клеток-прогениторов сетчатки человека являются глаза 17–19 недели гестации — из одной пары после пролиферации в культуре можно получить до 2^{50} клеток, пригодных для трансплантации. Полученные клетки экспрессируют маркеры раннего развития и способны к дифференцировке в специализированные клетки сетчатки *in vitro*. Описанные свойства, в т. ч. способность дифференцироваться в фоторецепторы, характеризуют эти клетки как перспективный материал для клеточной терапии различных дегенеративных состояний сетчатки глаза.

Характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, полученных методом трансдукции ретровирусами, несущими гены поддержания плюрипотентного состояния

Бернвальд В.В.¹, Ким И.И.¹, Гульева Н.А.¹, Повещенко О.В.¹,
Повещенко А.Ф.¹, Закиян С.М.², Коненков В.И.¹

¹ НИИКЭЛ СО РАМН, Новосибирск, Россия. 630117, ул.Тимакова 2,
т. (факс) 8 (383) 333-51-22

² ИЦиГ СО РАН, Новосибирск, Россия. 630090, пр.ак.Лаврентьева, 10,
т.8 (383) 363-49-80

Интерес к плюрипотентным стволовым клеткам связан с их способностью дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков, поэтому они имеют огромный потенциал применения в регенеративной медицине.

Цель работы: получение и характеристика индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из эмбриональных фибробластов человека методом трансдукции ретровирусами, несущими гены *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*.

Эмбриональные фибробласты человека были трансдуцированы ретровирусными векторами, несущими гены *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc*, *Klf4*. На 30 день культивирования было получено 18 стабильных ЭСК-подобных линий, 4 из которых были далее охарактеризованы. Во всех линиях ИПСК произошла интеграция вирусной ДНК в геном (ПЦР анализ). По морфологии полученные линии ИПСК схожи с ЭСК человека, экспрессируют щелочную фосфатазу. Иммуофлуоресцентный анализ показал, что в полученных линиях ИПСК происходит экспрессия транскрипционных факторов OCT4, NANOG, а также поверхностных антигенов SSEA4, TRA-1-60, TRA-1-81. ОТ-ПЦР анализ транскрипции генов показал, что полученные ИПСК схожи по паттерну экспрессии генов плюрипотентности как с ЭСК человека, так и между собой, а также в клетках эмбриональных телец происходит экспрессия маркеров дифференцировки: экто-, мезо-, энтодермы.

Таким образом, фундаментальное и прикладное значение подобных работ заключается в исследовании механизмов репрограммирования клеток, получении аутологичных ЭСК человека и животных, создание из фибробластов индивидуальных линий клеток, использования их в регенеративной медицине.

Адгезивность аллокератиноцитов к хитозановым матриксам

Бузинова Д.А.¹, Хмельницкая Е.А.^{1,2}, Шиповская А.Б.¹, Островский Н.В.^{1,2}

¹ *Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, 83*

² *МУЗ «Городская клиническая больница №7», 410005, г. Саратов, ул. Соколова, 306, E-mail: Vuzinova-86@mail.ru*

Одним из перспективных направлений восстановления структурной и функциональной активности кожного покрова при дермальных ожогах является использование тканеинженерных конструкций на основе резорбируемых матриц и выращенных в культуре многослойных пластов кератиноцитов. Ранее нами показана возможность адгезии, пролиферации и дифференциации эпителиоподобных клеток на пленочных матриксах из хитозана [1]. В настоящей работе предпринята попытка культивирования на пленках из хитозана клеток кожи человека.

Использовали тонкие (10–15 мкм), прозрачные пленки из хитозана ($M_n = 87$ кДа, СД = 80.8 мольн. %) в О-форме. На образцы пленок высевали аллокератиноциты, выделенные из донорских биоптатов кожи человека по стандартной методике [2], в концентрации $30 \cdot 10^4$ кл./см². Культивирование проводили в ростовой среде DMEM: F12 с добавлением 20 % эмбриональной сыворотки коров в атмосфере 5 % CO₂ при 37°C. Наблюдение за адгезией и пролиферацией клеток проводили на инвертированном микроскопе «Биолам П» с цифровой ССД-камерой DMC 300: объектив 40×, разрешение 3 Мрх.

Первые исследования показали высокую адгезию и пролиферацию аллокератиноцитов при их культивировании на пленочном матриксе из хитозана (рис.).

[1] Бузинова Д. А., Хмельницкая Е. А., Шиповская А. Б. и др. // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье». 2010. С.152–153.

[2] Rheinwald J. G. // Meth. Cell Biol. 1980. № 21 А. С.229–254.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 09–03-12193 офи_м).

Остеорегенерация при трансплантации тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и полилактидных носителей

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

¹ ЗАО «РеМеТэкс», Москва; ² ИППЛИТ РАН, Троицк; ³ МГНЦ РАМН, Москва; ⁴ НИИ МЧ РАМН, Москва

Трансплантация тканеинженерных конструкций (ТИК) является наиболее перспективным подходом для обеспечения репаративного остеогенеза при травматических и дегенеративных заболеваниях костной ткани. В отличие от используемых остеопластических материалов, ТИК позволяет обеспечить органотипическую регенерацию в области трансплантации за счет внесения пула остеопрогениторных клеток — источника гистогенеза. Нами разработана ТИК, состоящая из трех компонентов: мультипотентных стромальных клеток жировой ткани (МСК ЖТ), биорезорбируемых носителей из полимолочной кислоты, полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания, и обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТП). В работе изучали эффективность регенерации костной ткани при трансплантации ТИК в модели критических теменных дефектов у крыс. Выбранные носители характеризуются высокой биосовместимостью и могут применяться в тканевой инженерии. Использование ОТП, по данным многих исследователей, позволяет усилить ангиогенные свойства конструкции благодаря содержащимся в плазме факторам роста (PDGF β , VEGF, TGF- β), повысить выживаемость клеток при трансплантации и обеспечить субстрат для морфогенеза. Для изготовления ТИК использовали носители диаметром 5 мм, высотой 2 мм с порами 0,6х0,6 мм, аутологичные МСК ЖТ, преддифференцированных в остеогенном направлении, и ОТП. В черепе крысы резецировали участок теменной кости диаметром 6 мм и устанавливали конструкцию. На 10 суток после трансплантации ТИК наблюдали формирование рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой выявляли очаги ретикуло-фиброзной костной ткани. Центральное расположение очагов остеогенеза в регенерате и отсутствие связи с материнской костью свидетельствует о том, что источником регенерации является трансплантат. Объемная плотность костной ткани в регенерате составляла $11,4 \pm 0,7$ %, а в контрольной группе, где имплантировали носитель без клеток — $0,9 \pm 0,03$ %. Результаты экспериментального исследования показали высокую эффективность ТИК для обеспечения репаративного остеогенеза.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09–02–000935).

Коррекция неврологического дефицита в модели нарушений венозного кровотока головного мозга при трансплантации мезенхимальных стромальных клеток

Васильев И.А., Черных Е.Р*, Ступак В.В., Шевела Е.Я*., Останин А.А*.

ФГУ «ННИИТО» Минздравсоцразвития России 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17

**НИИ Клинической иммунологии СО РАМН 630099, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14*

В последние годы клеточные технологии рассматриваются в качестве новых альтернативных подходов к стимуляции репаративных процессов в центральной нервной системе. Среди различных типов клеток мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга привлекают особое внимание, поскольку продуцируют факторы, обладающие противовоспалительными, нейропротективными, про-регенераторными и про-ангиогенными эффектами. Эффективность ММСК было неоднократно продемонстрирована в модели окклюзии средне-мозговой артерии у крыс. Целью настоящей работы явилась оценка эффективности ММСК в модели локальной ишемии, вызванной нарушением венозного оттока. Моделирование венозного стаза в теменно-височной области сопровождалось выраженным отеком мозга и развитием грубых неврологических нарушений, которые самостоятельно не купировались. У животных, получивших клеточную терапию (опытная группа), неврологический дефицит снижался на 54–75 % по сравнению с контролем. В итоге к 21 дню в опытной группе регистрировались неврологические расстройства легкой степени. Эффект ММСК, вводимых на первые сутки послеоперационного периода, был значимо выше, чем при введении клеток на 7 сутки, что проявлялось более интенсивным снижением суммы баллов по модифицированной шкале оценки тяжести неврологических расстройств (Chen, 2001) и более быстрым восстановлением способности животных к самостоятельному приему пищи. Полученные нами данные впервые продемонстрировали способность ММСК корректировать неврологические нарушения в модели очаговой венозной ишемии головного мозга, характеризующейся низким уровнем спонтанного восстановления.

Элиминация нейроспецифических белков в ликвор и кровь после введения в большую цистерну мозга алогенных клеток эмбриональной нервной ткани крысам с ишемическим инсультом

Волков А.И., Лебедев С.В. Гурина О.И., Петров С.В. Гриненко Н.Ф., Савченко Е.А., Чехонин В.П

ФГУ «ГНЦ ССП им. В.П. Сербского», Росздрава, 119992 ГСП-2, Москва, Кропоткинский переулок, 23

Определение нейроспецифических белков (НСБ) в ликворе и крови является чувствительным методом для верификации текущего нейродегенеративного процесса. Ранее на модели экспериментального ишемического инсульта путём окклюзии средней мозговой артерии (оСМА) у крыс нами было показано, что вслед за повышением уровней НСБ в первые сутки после острой ишемии, отмечался второй пик концентраций примерно на 14 сутки, отражающий развитие вторичного нейродегенеративного процесса. Уровни НСБ в ликворе и крови коррелировали с показателями функционального состояния ЦНС [Петров С.В., Лебедев С.В., Гурина О.И., Чехонин В.П., 2005]. Не известно, оказывает ли имплантация нейрогенных стволовых клеток влияние на элиминацию НСБ?

Материалы и методы У взрослых беспородных крыс моделировали ишемический инсульт путем проксимальной окклюзии средней мозговой артерии (ОСМА) по методу Tamura в модификации Bederson. Сразу после этого крысам в большую цистерну мозга вводили клетки эмбриональной нервной ткани крысы (ЭНТкр) или фибробласты крысы (Фкр) в качестве «клеточного контроля». Отдельной группе крыс, проводили все этапы операции, за исключением окклюзии средней мозговой артерии — «ложная ОСМА» (ЛОСМА). В течение 3 месяцев оценивали функциональное состояние крыс с помощью неврологической шкалы Menzies, тестов пассивное избегание и кетамин-индуцированная вращательная асимметрия. Исследовали (метод ELISA) уровни нейронспецифической енолазы (NSE) и глиофибрилярного кислого белка (GFAP) в сыворотке крови на 7, 14 и 30 сутки и ликворе — на 14 сутки после операции. Для оценки жизнеспособности клеток ЭНТкр *in vivo* их метили витальным красителем CFDA SE. Через 90 суток после операции определяли размеры постинсультного дефицита вещества мозга на серийных коронарных срезах мозга, окрашенных по Нисслю.

Результаты Клетки ЭНТкр, меченые витальным красителем, обнаружены через 4 и 7 суток после введения в оболочках, выстилающих большую цистерну мозга. У крыс с оСМА и инфузией клеточных препаратов размеры постинсультного дефицита вещества мозга существенно не различались и составляли 291 ± 34 мм³, 288 ± 32 и 275 ± 26 мм³ в группах ОСМА, ОСМА+Фкр и ОСМА+ЭНТкр, соответственно. У крыс с ЛОСМА имел место минимальный неврологический дефицит по шкале Menzies через 3 суток после операции, который в дальнейшем полностью регрессировал. В группах с инсультом (ОСМА) нарушения функций ЦНС наблюдали по всем исследуемым показателям в течение 3 месяцев мониторинга. Функциональные показатели в группах ОСМА и ОСМА+Фкр не различались, тогда как в группе ОСМА+ЭНТкр по всем тестам происходило существенное восстановление функций ЦНС. Наряду с этим в группе ОСМА+ЭНТкр имело место достоверное снижение уровней NSE на 14 и 30 сутки в крови и NSE и GFAP на 14 сутки в ликворе по сравнению с группой ОСМА.

Таким образом, инфузия ЭНТкр в большую цистерну мозга оказала терапевтический эффект на функции ЦНС и способствовала снижению уровней НСБ в ликворе и сыворотке крови крыс с ишемическим инсультом.

Экспрессия мРНК BDNF в параинфарктной зоне после имплантации нейрогенных стволовых клеток крысам с инсультом в сенсомоторной коре

Волков А.И.¹, Лебедев С.В.¹, Павлов К.А.^{1,2}, Тер-Арутюнянц А.А.^{1,2},
Гриненко Н.Ф.¹, Савченко Е.А.¹, Чехонин В.П.^{1,2}

¹ ФГУ «ГНЦ ССП им. В.П. Сербского», Росздрави, 119992 ГСП-2,
Москва, Кропоткинский переулок, 23

² Кафедра медицинских нанобиотехнологий РГМУ, ГОУ ВПО РГМУ
Росздрави 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

В последние годы получило развитие представление о связи терапевтических свойств нейрогенных стволовых клеток (НСК) с выделением ими факторов роста. Конкретные механизмы такого действия НСК не известны. В частности остаётся нерешённым вопрос о возможности паракринных эффектов имплантированных клеток.

Цель работы заключалась в исследовании экспрессии BDNF в клеточных препаратах НСК *in vitro* и *in vivo* после их имплантации параинфарктно крысам с ишемическим инсультом в сенсомоторной зоне коры.

Методы. У взрослых крыс моделировали ишемический инсульт в зоне коркового представительства передней лапы путем удаления сосудов с поверхности мозга. Сразу после этого в кору мозга на границе зоны удаления сосудов имплантировали один из следующих клеточных препаратов: эмбриональная нервная ткань крыс (ЭНТкр), нейрогенные стволовые клетки обонятельной выстилки человека (НСКовч), фибробласты крысы (Фкр) в качестве «клеточного контроля». Экспрессию мРНК BDNF определяли методом ПЦР в реальном времени до введения клеточных препаратов (три пассажа культивирования клеток) и через 7 суток после их имплантации в кусочках ткани, взятой из мест имплантации клеток и участков без введения клеток.

Результаты. В клеточных препаратах до их имплантации экспрессия BDNF была минимальной. Уровень экспрессии мРНК BDNF в зонах имплантации клеток возрастал при имплантации Фкр, и НСКовч в 5–6 раз, а в зоне введения ЭНТкр — в 23 раза, в сравнении с периинфарктными зонами без имплантации клеток ($p < 0,01$, критерий Манна-Уитни).

Полученные результаты подтверждают возможность реализации терапевтического эффекта нейрогенных стволовых клеток за счёт экспрессии трофических факторов непосредственно в местах их пребывания в ткани реципиента.

Динамика концентрации ростовых факторов в крови крыс при интрамиокардиальном введении мезенхимальных клеток в условиях постинфарктного кардиосклероза

Головкин А.С., Великанова Е.А., Матвеева В.Г., Савельева Е.А., Понасенко А.В., Кремено С.В., Мухамадияров Р.А., Биктасова А.К., Барбараш Л.С., Еремеев А.В.*

НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово

**Красноярский центр репродуктивной медицины, г. Красноярск*

В настоящее время широко изучается терапевтическое влияние мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на процессы репарации различных органов. При этом остаются неразрешенными вопросы, касающиеся системных эффектов введения в организм МСК. В связи с этим целью работы явилась оценка содержания ростовых факторов TGF β и VEGF-C в крови крыс после интрамиокардиального введения мезенхимальных стволовых клеток в условиях постинфарктного кардиосклероза.

Материалы и методы: Работа была выполнена на 35 крысах-самцах линии Wistar массой тела 300–380 г. МСК выделяли из костного мозга бедренных и большеберцовых костей животных, культивировали во флаконах в питательной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 1 мМ/мл NEPES буфера, 10 % бычьей эмбриональной сыворотки, 2 мМ/мл L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 0,1 мкг/мл амфотерицина В (Sigma Aldrich, США) при 37°C и 5 % CO₂ в течении 14 суток. Адгезированную фракцию клеток снимали 0,5 % раствором трипсина (Sigma Aldrich, США) и ресуспендировали в 0,9 % растворе NaCl. Инфаркт миокарда моделировали путем локальной криодеструкции в области левого желудочка сердца. Через 21 день выполняли повторное оперативное вмешательство с целью местного интрамиокардиального введения суспензии МСК в периферическую зону в количестве 1×10^5 – $1,5 \times 10^5$. Животным контрольной группы вводили 0,9 % раствор NaCl сопоставимого объема. Животных выводили из эксперимента на 3, 7, 14 сутки. Все манипуляции осуществляли под эфирным наркозом. Методом твердофазного иммуноферментного анализа определяли концентрацию трансформирующего фактора роста β (TGF β , transforming growth factor β) и сосудисто-эндотелиального ростового фактора (VEGF-C, vascular endothelial growth factor-C) в сыворотке крови (Bender MedSystems, США).

Результаты: Через 3 суток после введения МСК наблюдалось достоверное увеличение содержания сывороточного TGF β по сравнению с контрольной группой. В динамике на 7 сутки отмечалось повышение уровня TGF β относительно значений данного показателя на 3 сутки в экспериментальной и контрольной группах животных. К 14 суткам содержание TGF β в сыворотке крови животных, которым интрамиокардиально вводились МСК, снижалось по сравнению с предыдущим изучаемым периодом, но было повышенным относительно значений в контрольной группе.

При исследовании содержания VEGF-C в сыворотке крови животных с постинфарктным кардиосклерозом были получены следующие результаты: концентрация изучаемого ростового фактора была статистически значимо выше, чем в контрольной группе, на 3 и 7 сутки после введения МСК в периферическую зону, достигая максимального значения к исходу первой недели. К 14 суткам уровень VEGF-C достоверно не отличался от такового в контрольной группе.

Таким образом, интрамиокардиальное введение мезенхимальных клеток в условиях постинфарктного кардиосклероза сопровождается повышением содержания TGF β и VEGF-C в крови крыс. При этом динамика концентрации в крови исследуемых ростовых факторов носит однотипный характер.

Формирование сфероидов из стромальных клеток жировой ткани при 3D культивировании

Горкун А.А.¹, Зурина И.М.², Кошелева Н.В.^{1,2}, Пулин А.А.¹, Сабурова И.Н.¹

¹ *НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН*

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

Ткани и органы представляют собой трехмерные структуры, в которых клетки находятся в 3D микроокружении, формируют контакты между собой и с межклеточным матриксом. Методами 3D культивирования уже получены 3D структуры из мышечных клеток (Sarig et al., 2006), кардиомиоцитов (Bartholoma et al., 2005) и из мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (Yoo et al., 1998). Целью нашего исследования стало изучение формирования сфероидов из стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) мыши.

СКЖТ мышей линий C57Bl/6J (GFP⁻) и C57Bl/6-Tg (ACTb-EGFP) 10sb/J (GFP⁺) выделяли по стандартному протоколу (Zuk et al., 2001) и до 3 пассажа вели в монослойной культуре. Для получения сфероидов использовали 3–6 дневное культивирование в «висячей капле» при различных начальных плотностях клеток: 25, 50 и 100 тыс. кл./мл.

Сфероиды формировались из СКЖТ, полученных от мышей GFP⁻ и GFP⁺ линий. При сокультивировании в «висячей капле» СКЖТ от мышей разных линий формировались сфероиды, состоящие из GFP⁻ и GFP⁺ клеток. Все сформированные сфероиды сохраняли жизнеспособность (окрашивание иодидом пропидия), их поверхностная зона состояла из двух-трех слоев вытянутых клеток. На третий день сфероиды диаметром 70–100 мкм формировались только при плотности 25 тыс. кл./мл. При плотности 50 тыс. кл./мл к третьему дню не наблюдали формирование сфероидов, сфероиды диаметром 100–120 мкм формировались на 4–5 день. При плотности 100 тыс. кл./мл сфероиды формировались лишь к седьмому дню культивирования, их диаметр составлял 120–150 мкм. Есть данные, что за 4 суток культивирования формируются сфероиды диаметром 600 мкм из МСК костного мозга крыс при плотности 100 тыс. кл./мл (Oshima et al., 2005) и сфероиды диаметром 800–1000 мкм из МСК костного мозга человека при плотности 6000 тыс. кл./мл (Potarova et al., 2007). СКЖТ за счет удобства получения и широкого дифференцировочного потенциала являются перспективными с точки зрения клинического применения, и дальнейшее развитие методики 3D культивирования может иметь важное фундаментальное и прикладное применение.

Исследование механизмов активации мезенхимальных клеток жировой ткани в ответ на воспалительное окружение

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

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119192, Ломоносовский пр., дом 31, корп. 5

Мезенхимальные клетки жировой ткани представляют большой интерес для клеточной терапии. Известны ангиогенные и нейрогенные факторы, обуславливающие эффекты мезенхимальных клеток при регенерации. Доказана эффективность применения этих клеток для восстановления кровоснабжения в ишемизированной конечности. В то же время, механизмы активации мезенхимальных клеток и их взаимодействия с тканеспецифическими стволовыми клетками и компонентами внеклеточного матрикса при репарации поврежденной ткани до конца не ясны. Воспалительный процесс, развивающийся сразу после повреждения, является одной из причин изменения морфо-функциональных характеристик мезенхимальных клеток, запускающего их деление, миграцию в поврежденную область и изменение экспрессии хемокинов регулирующих процессы репарации ткани.

Для изучения этих механизмов были использованы *in vitro* модели бесконтактного со-культивирования мезенхимальных клеток жировой ткани человека и промоноцитарной линии клеток ТНР-1, дифференцированных в макрофаги, и культивирование мезенхимальных клеток жировой ткани в среде, кондиционированной дифференцированными ТНР-1 в течение 24 и 48 часов. В качестве контроля мезенхимальные клетки культивировали в среде, кондиционированной дермальными фибробластами. Анализ изменения экспрессии провоспалительных, противовоспалительных факторов, хемокинов, а также молекул, стимулирующих миграцию клеток, был проведен с помощью метода RT-PCR.

Было показано, что со-культивирование мезенхимальных клеток жировой ткани с дифференцированными макрофагами вызывает увеличение экспрессии генов факторов воспаления (IL1 β , IL6, IL8, TNF α), ряда хемокинов (CCL2, CCL4, CXCL9, CCL19, CCL20), а также урокиназы, ее рецептора и MMP-9 - показателей миграторной активности клеток. Со-культивирование с фибробластами не оказывало влияния на изменение экспрессии этих хемокинов. Экспрессия другой группы генов противовоспалительных факторов - IL4, IL10 и TGF β , при со-культивировании с макрофагами в течение 24 и 48 часов не изменялась.

Полученные данные указывают, что при воспалении происходит активация мезенхимальных клеток при участии клеток воспаления. Изменяются их миграционные характеристики и уровень экспрессии ключевых хемокинов, регулирующих процессы регенерации с участием тканеспецифических стволовых клеток.

Возможности аутологичной клеточной терапии ишемической сердечной недостаточности

Гульева Н.А. *, Ким И.И. *, Повешенко О.В. *, Бернвальд В.В. *, Повешенко А.Ф. *, Колесников А.П. *, Янкайте Е.В. *, Хабаров Д.В. *, Комбанцев Е.А. *, Смагин А.А. *, Романов А.Б. **, Покушалов Е.А. **, Коненков В.И. *

* *НИИ КЭЛ СО РАМН, Новосибирск*

** *ФГУ «НИИ ПК им. ак. Е.Н Мешалкина Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи», Новосибирск*

Хроническая сердечная недостаточность является самым распространенным осложнением у больных, перенесших инфаркт миокарда. Новой стратегией лечения больных с кардиоваскулярной патологией является клеточная терапия путем использования аутологичных стволовых клеток.

Целью настоящего исследования является оценка функциональных свойств мононуклеарной фракции (МНК) периферической крови у пациентов с ишемической сердечной недостаточностью после мобилизации гранулоцитарным колоние-стимулирующим фактором (G-CSF).

Под действием G-CSF происходит мобилизация прогениторных клеток из костного мозга в периферическую кровь, что сопровождается увеличением уровня CD34+ клеток в среднем в 8,1 раз и составляет $0,68\% \pm 0,5\%$. CD34+CD133+ клетки составляют после мобилизации $0,06\% \pm 0,05\%$, CD34+KDR+ клетки — $0,1\% \pm 0,09\%$. МНК обладают высокой пролиферативной и низкой апоптотической активностью: активно реагируют на стимуляцию митогеном (по МТТ-тесту), около 11% клеток находятся в S/M фазах клеточного цикла, 3% — в апоптотическом состоянии. Изучение ангиогенеза *in vitro* показало образование капилляроподобных структур в Матригеле. МНК периферической крови после мобилизации в 48-часовой культуре продуцируют широкий спектр цитокинов как спонтанно, так и при стимуляции митогеном Кон-А: Th1 типа (IFN-g, IL-2), Th2 типа (IL-4 IL-5 IL-13), провоспалительные (TNF-a, IL-12) и противовоспалительные

цитокины (IL-10), ростовые факторы (GM-CSF, VEGF-A), хемокин IL-8, металлопротеиназы (Mmp1, Mmp2, Mmp3, Mmp9).

Таким образом, в результате исследования было показано, что под действием G-CSF происходит эффективная мобилизация прогениторных клеток, в том числе эндотелиальных предшественников, из костного мозга в периферическую кровь, что может быть использовано для репарации сердечной ткани кардиологических больных. Одним из механизмов действия МНК при трансплантации в поврежденном органе может быть их паракринный эффект.

Характеристика c-kit позитивных клеток в миокарде больных ишемической болезнью сердца

Дергилев К. В., ¹Рубина К.А., ¹Сысоева В.Ю., ²Гмызина А. И.,
^{1,2}Парфенова Е.В.

¹ ФФМ МГУ имени М.В.Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т 31-5

² ФГУ «РКНПК» Минздравсоцразвития, 121552, Москва, ул.3-я Черепковская 15а

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН), в подавляющем большинстве случаев постинфарктная, является одной из главных медицинских и экономических проблем в развитых странах. В связи с этим активно ведется поиск новых методов лечения, направленных на предотвращение ремоделирования левого желудочка и развития ХСН. В ряде исследований было показано, что сердце содержит стволовые клетки (СК) (c-kit+, sca-1+, isl-1+), обладающие способностью к дифференцировке в эндотелиальные, гладкомышечные клетки и кардиомиоциты *in vivo* и *in vitro*, а их введение в миокард после ИМ улучшает сократительную функцию сердца и уменьшает ремоделирование левого желудочка.

Задачей данного исследования было охарактеризовать c-kit+ клетки в ткани ушка правого предсердия, полученных в ходе проведения операции аортокоронарного шунтирования. Согласно данным проточной цитофлуориметрии содержание c-kit+ клеток в миокарде составляет 0,3–1%. C-kit клетки не несли гематопоэтических маркеров (CD34, Lin1). На основе экспрессии панлейкоцитарного маркера CD45 было выявлено две популяции c-kit клеток (c-kit+CD45+ и c-kit+CD45-). c-kit+CD45+ клетки локализовались преимущественно вблизи крупных сосудов и экс-

прессировали триптазу, что характеризует их как тучные клетки. Клетки с *c-kit*+*CD45*- были малочисленны и не окрашивались антителами к триптазе, что позволяет их рассматривать как истинные СК сердца.

Использование метода эксплантной культуры с последующей иммуномагнитной селекцией позволяет получить обогащенную популяцию *c-kit*+ клеток из ткани ушка правого предсердия, способных к пролиферации и дифференцировке в эндотелиальном и кардиомиоцитарном направлениях.

Таким образом, ткань миокарда ушка правого предсердия может быть перспективным источником для изучения аутологических СК взрослого организма.

Изменение функциональных свойств мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани при старении

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

Факультет Фундаментальной Медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, 119992, Ломоносовский пр-т, 31, 5

Введение. Мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из жировой ткани (МСК-ЖТ), являются перспективным типом клеток для терапии различных заболеваний ишемического генеза благодаря своей способности стимулировать рост кровеносных сосудов, в том числе путем секреции ангиогенных факторов роста. Однако возраст пациентов, которым планируется трансплантация аутологических МСК-ЖТ, может оказаться важным фактором, влияющим на эффективность клеточной терапии. Целью нашей работы было оценить изменения функциональных свойств МСК-ЖТ, включая их ангиогенную активность, при старении.

Материалы и методы. МСК-ЖТ были выделены из жировой ткани мышечной линии BalB/c, возраст животных составлял 1-2 мес. (МСК-ЖТ_{мол}, $n = 16$), 12 мес. (МСК-ЖТ_{взр}, $n=5$), 18 мес. и 24 мес. (МСК-ЖТ_{стар}, $n = 9$ и $n=7$, соответственно). Клетки культивировали до 2 пассажа. Затем в течение 48 часов их помещали в условия 1% (гипоксия) или 20% (нормоксия) содержания кислорода. Длину теломер определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Пролиферацию клеток оценивали с помощью коммерческого МТТ теста (Invitrogen). Способность МСК-ЖТ к остеогенной дифференцировке в остеоиндуктивной среде роста оценивали по уровню продукции щелочной фосфатазы. Измеряли уровень продукции клетками активных форм кислорода (АФК) и NO, а также

оценивали уровень экспрессии глутатион-пероксидазы в клетках. 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 капилляроподобных структур эндотелиальными клетками (HUVES) на Матригеле *in vitro*. Способность МСК-ЖТ стимулировать рост кровеносных сосудов *in vivo* оценивали на модели подкожных имплантатов Матригеля старым мышам (возраст 18 мес., $n=3$).

Результаты. Скорость пролиферации МСК-ЖТстар оказалась в 2 раза меньше по сравнению с клетками молодых животных. При этом длина теломер в МСК-ЖТстар была в 4 раза меньше по сравнению с МСК-ЖТмол. МСК-ЖТстар обладали более выраженной способностью к остеогенной дифференцировке. В МСК-ЖТвзр и МСК-ЖТстар продукция АФК и NO была повышена, а экспрессия глутатион-пероксидазы — снижена. Содержание мРНК фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и плацентарного фактора роста (PlGF) было выше в МСК-ЖТмол по сравнению с другими возрастными группами, в то время как уровень фактора роста гепатоцитов (HGF) был выше в МСК-ЖТвзр и МСК-ЖТстар. Экспрессия антиангиогенных факторов эндостатина и тромбоспондина значимо не отличалась в клетках от животных разного возраста. Наблюдалось статистически значимое повышение генной экспрессии факторов системы клеточных протеаз (рецептор к урокиназе, металлопротеиназы 2 и 9 типов, ингибитор активатора плазминогена-1) в МСК-ЖТстар по сравнению с МСК-ЖТмол как в нормоксических, так и в гипоксических условиях. Суммарная длина капилляроподобных структур, образованных HUVES на Матригеле в присутствии КС от МСК-ЖТмол, была статистически значимо больше, чем от МСК-ЖТстар, что свидетельствует о более выраженной секреции ангиогенных факторов клетками молодых животных. МСК-ЖТмол лучше МСК-ЖТстар стимулировали васкуляризацию подкожных имплантатов Матригеля, введенных старым мышам. Изменения экспрессии генов ангиогенных факторов в ответ на гипоксию зависели от возраста доноров, так, стимуляция экспрессии VEGF, PlGF и HGF в условиях гипоксии была выражена сильнее всего в МСК-ЖТмол. Однако увеличение способности стимулировать образование капилляроподобных структур после культивирования в условиях гипоксии значимо не различалось для клеток от доноров разного возраста.

Таким образом, при старении в МСК-ЖТ происходит изменение профиля экспрессии про- и антиангиогенных факторов роста, что сопровождается снижением способности этих клеток стимулировать рост кровеносных сосудов.

Влияние провоспалительного цитокина интерлейкина-17 на экспрессионный профиль мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани

Иванова Д.П., Калинина Н.И., Лопатина Т.В., Ткачук В.А.

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) участвуют в процессах регенерации различных тканей, в первую очередь благодаря секреции различных биологически активных факторов, влияющих на клетки поврежденной ткани, а так же за счет способности дифференцироваться в различных направлениях. МСК обладают иммуномодулирующими свойствами, как за счет секреции различных биологически активных факторов, так и посредством межклеточных адгезионных взаимодействий с иммунными клетками. Однако изменение функциональной активности МСК под действием продуцируемых клетками иммунной системы цитокинов, таких как интерферон- γ , интерлейкины-6 и -17, которые участвуют в регуляции воспаления и ремоделирования тканей, остается мало изученным. Недавно было показано, что интерлейкин-17 способен стимулировать дифференцировку и пролиферацию МСК костного мозга. Однако каким образом этот цитокин влияет на функциональную активность МСК до сих пор остается неизученным.

Генное профилирование с помощью транскрипционных матриц показало, что в ответ на действие интерлейкина-17 экспрессия провоспалительных факторов в МСК жировой ткани не меняется. Наоборот, интерлейкин-17 активировал провоспалительный фенотип данных клеток: в них возрастает уровень экспрессии интерлейкина-6, моноцитарных хемотаксических факторов CCL2 и CCL8, а также классических матриксных металлопротеиназ MMP1 и MMP3 и центрального компонента комплемента белка С3. Полученные данные указывают на то, что участие МСК в регуляции воспаления и иммунного ответа зависит от влияния на них иммунных клеток.

Мезенхимальные клетки жировой ткани стимулируют восстановление общего малоберцового нерва мышцы после травмы

Карагяур М.Н., Стамбольский Д.В., Лопатина Т.В., Калинина Н.И., Ткачук В.А.

Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани (МСК-ЖТ) стимулируют восстановление поврежденных тканей благодаря секреции биологически активных факторов. Нами было показано, что экспрессия большинства трофических факторов увеличивалась в разы при культивировании МСК в гипоксических условиях.

В представленной работе было изучено влияние однократной аппликации культивированных в условиях сниженного содержания кислорода МСК-ЖТ на восстановление общего малоберцового нерва мышцы. В работе использовали мышей (гибриды F1 СВА/С57В1, самцы, 20–25 г). МСК выделяли из подкожного жира передней брюшной стенки и паховой области сингенных мышей. Для эксперимента использовали МСК-ЖТ 2 пассажа, культивированных в течение 48 часов в условиях 1 % содержания O₂. После травмы общего малоберцового нерва мышцы по типу аксонотмезиса (по Сэддону) на место повреждения апплицировали 106 МСК-ЖТ в матригеле. В контрольных группах апплицировали гель без клеток или фибробласты мышцы линии N1N3T3 в геле. Восстановление функции мышц-разгибателей пальцев оценивали на 1-й, 2-й, 4-й, 7-й и 11-й дни. Восстановление скорости проведения возбуждения нерва измеряли с помощью электрофизиологических методик, оценивая амплитуду и латентный период суммарного потенциал действия нерва (СПДН), через 7 и 11 дней после повреждения.

В группе животных, которым на место повреждения нерва были нанесены МСК, скорость восстановления функций мышц-разгибателей пальцев (моторной веточки общего малоберцового нерва) была выше. Различия в восстановлении функций мышц-разгибателей пальцев наблюдали уже через 2 дня после операции ($p < 0,01$). Также у животных, которым были трансплантированы МСК, быстрее происходило восстановление скорости проведения возбуждения по нерву. Через 7 дней после повреждения в группе мышей, получивших МСК амплитуда СПДН была в 2 раза выше, чем в контроле ($p < 0,01$). Количество участвующих в проведении возбуждения нервных волокон у животных данной группы также было достоверно больше, чем в контроле ($p < 0,01$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что аппликация МСК-ЖТ стимулирует восстановление поврежденного нерва, по-видимому, благодаря продукции нейротрофических факторов.

Подкожные имплантации нейральных стволовых клеток способствуют восстановлению когнитивных функций у крыс с моделированием минимальных мозговых дисфункций

Карасёв А.В., Лебедев С.В., Викторов И.В., Гриненко Н.Ф., Савченко Е.А., Чехонин В.П.

ФГУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского», 119992, Москва, ГСП-2, Кропоткинский пер., 23

Последствия легких перинатальных повреждений проявляются в виде синдрома минимальных мозговых дисфункции (ММД) — дефицита памяти и способности к обучению. Эффективные средства лечения отсутствуют. Внедрение новых средств лечения обусловлено необходимостью проведения экспериментальных работ. ММД воспроизводили путем помещения 1-дневных крысят в атмосферу азота на 25 минут (Speiser Z. et al 1983). Ежедневно до периода половозрелости (8 недель) проводили мониторинг функций памяти в тесте пассивного избегания и обучаемости (У-образный лабиринт). Клеточные препараты нейральных стволовых клеток обонятельной выстилки человека (НСКовч), эмбриональной нервной ткани крыс (ЭНТкр) и фибробластов крысы (Фкр — клеточный контроль) вводили только под кожу через 3е суток после моделирования повреждений. Расчет функционального дефицита и эффективности клеточной терапии проводили в конце эксперимента (возраст крыс 8 недель) с учетом максимально-возможного уровня восстановления функций (показатели относительно групп интактных животных и клеточного контроля). У животных с ММД, не подвергавшимся клеточной терапии, зарегистрировано устойчивое снижение функции памяти (тест «пассивное избегание») и способности к обучению в У-образном лабиринте. Функциональный дефицит к концу эксперимента составил у них 37 % и 36 %, соответственно. Имплантации Фкр (клеточный контроль) не оказали существенного влияния на изучаемые показатели, а имплантации НСКовч и ЭНТкр привели к значительному восстановлению нарушенных функций. Так, дефицит функции памяти в группах НСКовч и ЭНТкр был полностью нивелирован к концу эксперимента. Это подтверждается анализом доли крыс, сохранявших рефлекс пассивного избегания, выработанный на 4 неделе жизни крысят. Дефицит способности к обучению у крысят с ММД, после подкожных имплантаций существенно уменьшился в три раза и составил по 12 %. Эффективность подкожных имплантаций ЭНТкр и НСКовч составила по способности к обучению

(У-образный лабиринт) 47 % и 47 %, соответственно, а при оценке функции памяти (тест «пассивное избегание») 52 % и 62 %, соответственно. Полученные данные могут быть использованы для планирования экспериментов по доклинической оценке эффективности клеточных препаратов и разработке протоколов клеточной терапии ММД.

Применение красителя CFDA-SE для визуализации имплантированных клеток

Карасёв А.В., Лебедев С.В., Викторов И.В., Гриненко Н.Ф., Савченко Е.А., Лазаренко И.П.

ФГУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского», 119992, Москва, ГСП-2, Кропоткинский пер., 23

Существуют несколько флюоресцентных красителей, которые не нарушают жизнеспособность клеток. Среди них достаточно распространен карбоксифлюоресцеин диацетат сукцинимидный эфир (CFDA-SE). Однако возможность его применения с целью визуализации имплантированных клеток в отдаленные сроки не определена. Последнее связано с отсутствием представлений о максимальных концентрациях CFDA-SE, не вызывающих токсической гибели клеток *in vitro*. Решение этой задачи явилось целью данной работы.

В работе использованы культуры нейральных стволовых клеток из обонятельной выстилки человека (НСКовч) и культуру фибробластов Rat2 (Фкр). К суспензии клеток (1×10^6 в 100мкл DMEM) добавляли раствор CFDA-SE в 10 % DMSO в концентрациях 5, 10, 15, 20, 25 мкМ/мл. Клетки инкубировали при 37° в течение 30 мин. Клетки центрифугировали, среду заменяли и помещали в инкубатор. Через 7 суток для дальнейших экспериментов отбирали культуру окрашенную CFDA-SE в максимальной концентрации, в которой отсутствовала значительная гибель клеток — 20МкМ/мл. Выживаемость определяли с помощью реакции вытеснения Трипанового синего, которая составляла не менее 90 %. Клетки имплантировали (3×10^5 клеток в 3 мкл) интактным крысам в возрасте 10 дней в область СА1 гиппокампа или подкожно в межлопаточную область. Спустя 3, 7, 14, 28 дней животных глубоко наркотизировали, проводили перфузию 4 % раствором параформальдегида, готовили заморо-

женные срезы области имплантации. При флюоресцентной микроскопии областей трансплантации препаратов НСКовч и Фкр на сроках 3, 7 и 14 суток визуализировали интенсивное зеленое свечение (515 nm). В других диапазонах свечение отсутствовало. На сроке 28 суток появлялась флюоресценция в красном диапазоне, что свидетельствует о биodeградации красителя. Таким образом, оптимальной концентрацией CFDA-SE для сохранения жизнеспособности клеток *in vivo* является 20 Мкм/мл, что позволяет визуализировать живые клетки в течение не менее 14 суток после имплантации.

Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий для лечения ран при локальной ишемии нижних конечностей

Кауламбаева М.З.¹, Бименов К.С.¹, Узбеков М.Б.¹; Беспаяев А.Т.²

¹ *ТОО Научно-производственное предприятие «Антиген», г. Алматы, Казахстан.*

² *АО «Национальный научный медицинский центр» г.Астана, Казахстан.*

Целью данной работы было обосновать эффективность применения культур аутологичных стволовых клеток костного мозга и клеток диплоидного штамма фибробластов человека ЭФЧ 01/05, иммобилизованных на коллагеновом матриксе для лечения ран при экспериментально воспроизведенной локальной ишемии нижних конечностей.

Опыт проводили на кроликах массой 3–4 кг, 18 голов. Животные разделены на три группы. Животным первой группы вводили в/м в область раны в несколько точек 1мл суспензии культивируемых аутологичных клеток костного мозга (АККМ) в концентрации 1 млн. клеток. Затем 1,5 мл суспензии смешали с коллагеновым матриксом и в виде геля наносили на поверхность раны. Поверхность раны закрывали коллагеновой мембраной. Животным второй группе проводили аналогичные манипуляции с использованием суспензии культуры клеток эмбриональных фибробластов человека ЭФЧ 01/05. Животным третьей группы (контрольной) на рану наносили мазь метилурациловую 10 %. Введение клеточных суспензий на коллагеновом матриксе повторяли 4-хкратно. На 7 и 14 сутки после начала лечения животным под местной анестезией удаляли фрагмент раневой поверхности для приготовления гистологических препаратов, на-

носили контуры ран на прозрачные пленки, для определения размера ран, производили забор крови для анализа на печеночные пробы АсАТ и АлАТ.

В результате проведенных исследований было определено, что наиболее оптимальным методом лечения ран при локальной ишемии нижней конечностей является введение культивируемых аутологичных клеток костного мозга (АККМ). В этом случае происходит почти полное заживление раны ($82,3 \pm 4,6$ %) и показатели крови на печеночные пробы АсАТ и АлАТ приходят в норму на 7 сутки лечения. Во второй испытуемой группе так же происходит заживление ран, но не столь активно, как первой. Площадь заживления раны составляет $64,5 \pm 6,5$ % и показатели крови на печеночные пробы приходят в норму только на 14 сутки лечения. Применение метилурациловой мази в контроле за 14 суток приводит к заживлению только $40 \pm 4,5$ % поверхности раны, а показатели крови не приходят в норму, что указывает на локальную ишемию.

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что применением аутологических мезенхимальных клеток костного мозга в сочетании с коллагеновым матриксом для лечения ран при экспериментально воспроизведенной локальной ишемии нижних конечностей является более эффективным по сравнению с традиционными методами.

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

Экспериментальное обоснование применения клеточных технологий для профилактики несостоятельности легочных швов

Кауламбаева М.З.¹, Амиргазиева М.К.¹, Стабаева Г.С.¹, Бименов К.С.¹; Колос А.И.², Орекешова А.М.²

¹ НПП «Антиген», Алматы, Казахстан, E-mail: marzan61z@mail.ru

² Национальный научный медицинский центр, Астана, Казахстан

В хирургии нет более важной проблемы, чем предупреждение и борьба с послеоперационными осложнениями. Особую опасность представляет собой ранняя и поздняя несостоятельность легочных и бронхиальных швов, которая влечет за собой тяжелые последствия в виде развития гнойно-воспалительных процессов, бронхоплевральных свищей, обуславливающих высокую инвалидность и послеоперационную летальность. По данным ли-

тературы частота осложнений при операциях на легких с формированием легочно-бронхильно-плевральных свищей наблюдается в 7,3 % случаях.

Цель работы: — экспериментальное обоснование применения культур мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека и клеток диплоидного штамма фибробластов человека ЭФЧ 01/05 на коллагеновом матриксе для профилактики несостоятельности легочных швов.

Работу проводили на кроликах весом 3–4-кг, возрастом 10–12 месяцев в количестве 36 голов. Подопытные животные были разделены на 4 группы (одна контрольная и три испытуемые). Подопытным животным после введения наркоза и обработки операционного поля произведена правосторонняя торакотомия, пневмоторакс. После иссечения легочной ткани на рану были наложены швы. На поверхность швов у животных испытуемых групп была нанесена суспензия клеток (МСК или ЭФЧ 01/05) в коллагеновом геле и наложена коллагеновая мембрана.

У животных первой контрольной группы — на 3 сутки швы не состоятельны, на 7 и 14 сутки после операции швы состоятельны, но не герметичны. Во второй испытуемой группе (наложение на шов только коллагеновой мембраны) — на 3 и 7 сутки швы состоятельны, но не герметичны, на 14 сутки шов состоятелен и герметичен. В третьей испытуемой группе (с нанесением суспензии клеток ЭФЧ 01/05 с наложением коллагеновой мембраны) — на 3 сутки швы состоятельны, на 7 и 14 сутки швы состоятельны и герметичны. В четвертой испытуемой группе (с нанесением суспензии клеток МСК человека с наложением коллагеновой мембраны) на 3 сутки швы состоятельны, на 7 и 14 сутки швы состоятельны и герметичны.

При гистологических исследованиях легочных швов, наложенных после иссечения части легкого, показали следующее. По сравнению с контрольной группой, у экспериментальных животных, у которых поверхность хирургически травмированной легочной ткани обработана коллагеновой мембраной, культурой фибробластов с коллагеном и культурой мезенхимальных стволовых клеток, клеточные и тканевые реакции были более ярко выраженными. Это свидетельствует о стимулирующем влиянии культур клеток фибробластов и МСК на репаративные процессы.

На основании полученных результатов макроскопических и гистологических исследований можно утверждать, что применение клеточных технологий и тканевой инженерии для профилактики несостоятельности легочных швов является наиболее оптимальным способом лечения.

Стратегия построения тканеинженерных конструкций кожи на раневой поверхности *in vivo*

Ковалев А.В.

ФГУ «ЦИТО им. Н.Н.Приорова Росмедтехнологий»

Существует идеальная стратегия инжиниринга тканей, которая состоит в заборе стволовых клеток у пациента, дальнейшем их размножении в клеточной культуре и высеве этих клеток на каркасы (Butteri D. K., Bishop E. E., 2006). Предполагается, что при этом стволовые клетки могут дать начало множеству типов специализированных клеток в результате их дифференцировки под воздействием разнообразных биологических стимулов. После имплантации конструктор, полученный при инжиниринге тканей должен выжить, интегрироваться с окружающими тканями, восстановить структурную целостность органа и его функцию. При реализации этой стратегии возникла проблема, связанная с гибелью в процессе интеграции значительной части клеток, что поставило под сомнение возможность развития полноценного «заместительного сценария» в регенеративной медицине. Биологическую основу регенеративной медицины должны составлять гистогенезы, управляемые или направляемые извне с целью достижения требуемого эффекта (Ярыгин В. Н., 2006). Ткань образуют ряд клеточных дифферонов или гистогенетических рядов, которые должны быть воссозданы в биоискусственной ткани. Для формирования полных дифферонов нужны ниши стволовых клеток, позволяющие создавать стабильные биологические структуры способные к физиологической регенерации.

Возможность сформировать правильную трехмерную структуру со специфическим рельефом и микрорельефом поверхности на месте дефекта кожи методами тканевой инженерии может позволить на новом техническом уровне решать ряд проблем современной пластической, реконструктивной и косметической хирургии.

В эксперименте на коже лабораторных крыс нами изучен морфогенез регенерирующего эпителия из аутологичных микрографтов волосяных фолликулов, имплантированных в каркас, плотно прижатый к раневой поверхности. Рана весь период наблюдения окружалась периодически заменяемой питательной средой внутри специального биореактора, в который погружалась травмированная часть тела животного. Известно, что волосяной фолликул несет две популяции стволовых клеток (в области дермального сосочка и бугорка волосяного фолликула). В отсутствии иных

источников кератиноцитов, аллогенная децеллюлярная дерма, покрытая слоем фибрина, покрывалась в течение 3–4 суток распластанными эпидермоцитами волосяных фолликулов. Несмотря на атипичность регенерировавшего эпидермиса, под ним происходила регенерация соединительной ткани по каркасу по типу реституции с формированием органотипического регенерата соединительной ткани. Пересаженные дериваты успешно интегрировались в регенерат кожи.

В условиях водной среды наблюдалось быстрое вживление трансплантированного комплекса с формированием органотипического регенерата соединительной ткани, имеющего выраженные дермальные сосочки, кожные дериваты и волокнистый остов, свойственный нормальной дерме. Наблюдалось также отсутствие фиброза регенерата и правильная архитектура микроциркуляторного русла кожи, сохраняемые к 6 мес наблюдения.

Полученные данные позволяют продемонстрировать новый подход к тканевому инжинирингу кожи, когда в конструкт вносятся не культура клеток, а упорядоченно группы клеток на внеклеточном матриксе, отличном от основной массы каркаса, что позволяет быстро и на длительный срок сформировать гистогенетические ряды в структуре восстанавливаемых органов. Применение слоя фибрина, инициирующего миграцию и регенерацию эпителия, в составе конструкции матрицы демонстрирует целесообразность модификации составов матриц, которая должна учитывать регенеративный тип гистогенеза.

В настоящее время ведутся исследования по созданию биоискусственных фолликулов, которые в будущем могут заменить аутологичные фолликулы.

Ко-культивирование стволовых клеток и целевой культуры приводит к её замещению потомками стволовых клеток, дифференцированных в клеточный тип целевой культуры

Ковина Марина¹, Ходарович Юрий²

¹ *Институт Биохимии им. Баха РАН, 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2*

² *Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Для дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) был предложен модифицированный метод контактной дифференцировки. Модификация заключалась в длительном ко-культивировании ЭСК и целевой культуры клеток с многократным пересевом. Пересев клеток останавливает объёмный рост сформировавшихся колоний ЭСК и открывает поверхность внутренних клеток колоний для контактных сигналов дифференцировки со стороны целевых клеток. Показано, что при таком способе ко-культивирования эндотелиоцитов крысы и ЭСК мыши можно подобрать условия, обеспечивающие практически 100 % дифференцировку мЭСК в эндотелиоциты и отсутствие в конечной культуре исходных эндотелиоцитов крысы. Аналогичный подход использовался для дифференцировки мЭСК в адипоциты. Разработанный метод контактной дифференцировки может быть предложен для дифференцировки ЭСК и в другие типы клеток.

Аутологичная система бесфидерного культивирования эмбриональных стволовых клеток человека

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

*Институт цитологии РАН, Отдел клеточных культур,
Санкт - Петербург, Россия*

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) человека представляют собой уникальный и ценный материал для различных фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований. Плюрипотентность и неограниченная пролиферация — два основополагающих свойства ЭСК. Поддержание этих свойств является одной из главных задач при работе с ЭСК в культуре.

Традиционно для культивирования ЭСК человека используют слой фидерных клеток. Результат такого сокультивирования двух клеточных систем довольно изменчив, так как каждая из этих систем не является стабильной и в свою очередь зависит от условий культивирования. Переход на бесфидерную систему культивирования позволяет исключить нежелательную изменчивость ЭСК, обусловленную нестабильностью фидерных клеток. Использование различных белковых субстратов позволяет решить эту задачу.

В данной работе представлены результаты по переводу ранее полученной линии ЭСК человека SC5 в условия бесфидерного культивирования.

В качестве субстрата использовали внеклеточный матрикс (ВКМ), наработанный мезенхимными фибробластами человека, полученными при дифференцировке клеток линии SC5 в мезодермальном направлении.

Для получения ВКМ, клетки снимали с поверхности пластика без использования химических агентов (механически, путем сбивания монослоя струёй среды).

Линию ЭСК человека SC5 культивировали на этом матриксе в среде, содержащей 80 % DMEM/F12, 20 % Knockout Serum Replacement medium, 2 mM L-glutamine 1 % nonessential amino acids, 0.5 mM 2mercaptoethanol and 80ng/ml bFGF. При этом половина этой среды была кондиционированной. Кондиционированную среду получали от мезенхимных клеток (дифференцировка линии SC5). Применение кондиционированной среды позволило отказаться от применения фактора роста TGFb1. При этих условиях ЭСК культивировались в течении 21 пассажа.

Гистохимический анализ выявил высокую активность щелочной фосфатазы. Иммунофлуоресцентный анализ показал наличие экспрессии транскрипционного фактора Oct-4 и поверхностных антигенов SSEA-4 и TRA-1–60, подтверждающих статус ЭСК человека, а также возникающую при дифференцировке *in vitro* экспрессию антигенов, характерных для производных эктодермы, мезодермы и энтодермы. В данной бесфидерной системе ЭСК человека активно делятся и анализ среднего времени удвоения клеточной популяции не выявил различий между сублинией, культивируемой на фидере и той, что была переведена в бесфидерную систему. Среднее время удвоения составило 28.2 ± 0.6 ч и 28.9 ± 0.8 ч. Каротип нормальный — 46, XX

Таким образом, полученная сублиния (прошла 108 клеточных удвоений) соответствует основным требованиям, предъявляемым к ЭСК человека.

Использование дифференцированных стволовых клеток в качестве источника субстрата и ростовых факторов является эффективным альтернативным методом вместо широко распространенной фидерной системы культивирования ЭСК на фибробластах человеческого происхождения.

Трансплантация генетически модифицированных скелетных миобластов при экспериментальной терапии инфаркта миокарда у крыс

Конопляников М.А. , Хайдер Х., Ашараф М.

Университет Цинцинати, Цинцинати, США

Задачей настоящего исследования была проверка предположения о том, что использование нескольких терапевтических генов для модификации скелетных миобластов (СМ) будет обеспечивать повышенный цитопротекторный эффект как для трансплантируемых клеток, так и для кардиомиоцитов организма-хозяина; а также то, что геномодифицированные СМ после их локальной трансплантации в зону экспериментально вызванного инфаркта у лабораторных крыс будут усиливать пролиферацию и дифференцировку трансплантированных и резидентных стволовых клеток, активировать ангиогенез, тормозить расширение инфарктной зоны и улучшать показатели функции сокращения сердца.

Для этих целей от трансгенных крыс самцов, меченных геном GFP+, были получены культуры СМ, отдельно трансфецированные плазмидами, кодирующими человеческие

IGF-1, VEGF, SDF-1 α и HGF. Анализ полученных культур методами RT-PCR и вестерн-блоттинга клеточных лизатов свидетельствовал о значительно более выраженной экспрессии в них факторов роста, что обеспечивало противоапоптотический и ангиостимулирующий эффект. Выраженным антиапоптотическим эффектом в опытах *in vitro* также обладала кондиционная среда из под культур трансфецированных СМ. При локальном введении трансфецированных СМ в зону инфаркта у крыс наблюдали более быстрое уменьшение размеров инфарктной зоны, повышение плотности сосудистой сети и увеличение фракции выброса при сравнении с эффектами нетрансфецированных СМ.

Таким образом, использование стволовых клеток, трансфецированных несколькими терапевтическими генами, может стать новым подходом при решении проблемы восстановления тяжелых повреждений тканей сердца.

Использование радиоактивно меченных мезенхимальных стволовых клеток для целей радиоизотопной диагностики

Коноплянников А.Г., Давыдов Г.А., Смолярчук М.Я., Конопляников М.А., Курсова Л.В., Петриев В.М., Скворцов В.Г., Коноплянникова О.А., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш., Семенкова И.В., Агаева Е.В., Князев О.В., Лазебник Л.Б., Цыб А.Ф.

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

В настоящее время принято считать, что основной терапевтический эффект системно (внутривенно) трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) связан со способностью этого типа клеток к специфическому «хомингу» в участки повреждения, которые могут продуцировать провоспалительные цитокины и другие сигнальные молекулы, с усиленной адгезией МСК к стенкам кровеносных сосудов в таких участках и миграцией клеток в перичитарную зону с последующим выделением паракринных факторов — по преимуществу противовоспалительных и трофических агентов, которые ингибируют процессы воспаления, а также гибели паренхиматозных клеток, переключая их на регенеративные процессы в поврежденном участке ткани (Minguell J., Erices A., Conget P., 2001; Цыб А. Ф., Коноплянников А. Г., Колесникова А. И. и др., 2004; Le Blanc K, Ringden O., 2005; Lee R., Pulin A., Seo M. et al. 2009; Parekkadan B., Milwid J. M., 2010). Эти данные о специфическом «хоминге» системно введенных МСК в поврежденные участки тканей позволили нам предположить, что введение относительно небольших количеств радиоактивно меченных МСК в организм с наличием поврежденных зон может быть успешно использовано для целей радиоизотопной диагностики. В этой связи в МРНЦ РАМН были разработаны методы мечения МСК, выращенных из клеток костного мозга человека или лабораторных животных, с помощью изотопов Te^{99m} и Re^{188} , достаточно широко используемых в радиоизотопной диагностике (Коноплянников А.Г., Петриев В.М., Кальсина С.Ш. и др., 2007). Используя полученные таким способом радиоактивно меченые МСК нам удалось обнаружить их повышенное накопление в радиочувствительных органах и тканях лабораторных животных, которые были подвергнуты воздействию сублетальных и летальных доз ионизирующей радиации (Коноплянников А. Г., Петриев В. М., Коноплянникова О. А. и др., 2008).

На основе разработанного протокола пилотных клинических исследований к настоящему времени мы получили данные о динамике поступления меченных $\text{Te}^{99\text{m}}$ МСК у 5 пациентов, у двух из которых ранее были диагностированы поражения сердечной мышцы, два пациента имели болезнь Крона и у одной больной были поздние лучевые поражения стенки мочевого пузыря. Общая введенная доза $\text{Te}^{99\text{m}}$ для целей сцинтиграфии всего организма у всех пациентов была на уровне 300–350 МБк. Сразу после введения меченых клеток и через 1, 3 и 18 часов после этого с использованием гамма-камеры проводили сцинтиграфические исследования организма пациентов. Было констатировано, что у всех пациентов в первые 3 часа после системного введения радиоизотопная метка в свободном виде практически отсутствует, поэтому в этот период времени можно было выявлять участки специфического «хоминга» стволовых клеток. Такие зоны у всех пациентов были установлены и они соответствовали известным нам ранее поражениям в мышце сердца, толстом кишечнике и стенке мочевого пузыря. Наряду с этим у части наших пациентов были найдены дополнительные участки патологической фиксации МСК, наличие которых в дальнейшем было подтверждено при расширенном клиническом исследовании, в том числе и с использованием методов МРТ и других современных диагностических методов. Таким образом, можно заключить, что метод трансплантации радиоактивно меченных МСК может значительно расширить возможности современной радиоизотопной диагностики.

Влияние клотримазола на пролиферацию фибробластоподобных стромальных клеток жировой ткани крыс, индуцированную основным фактором роста фибробластов

Кремено С.В., Биктасова А.К., Веремеев А.В., Матвеева В.Г., Головкин А.С., Журавлева И.Ю.*

*НИИ Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, Кемерово; * ООО «Метида», Кемерово*

Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы промежуточной проводимости, играя важную роль в поддержании мембранного потенциала клеток, принимают участие в модуляции пролиферации фибробластоподобных стромальных клеток (ФСК).

Цель: оценить влияние блокатора Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов — клотримазола на пролиферацию фибробластоподобных стромальных клеток жировой ткани крыс, индуцированную основным фактором роста фибробластов (bFGF).

Материал и методы: ФСК получали из подкожной жировой ткани абдоминальной области крыс линии Wistar путем миграции клеток на поверхность культурального пластика в среде DMEM с L-глутамином, содержащей 10 % ЭТС, 1 % NEPES при 37°C и 5 % CO_2 . Состав клеточной культуры оценивали цитофлуориметрически по содержанию CD90 и CD45-позитивных клеток. Для модификации пролиферативной активности клетки 3 пассажа в концентрации 5×10^4 клеток на лунку (9,6 см²) культивировали в среде с добавлением bFGF (1, 5, 10, 15 и 20 нг/мл) и клотримазола (10 мкМ) в течение 5 суток. Клетки снимали раствором 0,25 % трипсин-ЭДТА, рассчитывали коэффициент пролиферации (КП) как отношение количества клеток до и после их культивирования.

Результаты: Полученная из жировой ткани культура МСК имела в составе 95 ± 3 % CD90⁺CD45⁻-клеток, 5 ± 1 % CD90⁺CD45⁺-клеток. КП клеток в отсутствие FGFb и клотримазола составил $2,9 \pm 0,4$. Максимальный прирост количества клеток наблюдался при добавлении 10 нг/мл FGFb, при этом КП составил $6,4 \pm 1,4$. Данный эффект FGFb нивелировался в присутствии клотримазола. Культивирование клеток только в присутствии блокатора Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов также не сопровождалось изменением КП по сравнению с контрольной группой. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о возможности участия Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов в реализации пролиферативного действия основного фактора роста фибробластов на фибробластоподобные стромальные клетки из жировой ткани.

Поддержано грантом губернатора Кемеровской области № 48/14-ГВП.

Создание трансплантатов костной ткани *in vitro*, на основе синтетического матрикса и клеточного материала

Кульнева Е.И., Коржикова С.В., Тепляшин А.С.

*ООО «Бьюти Плаза», Центр клеточных технологий
107031 г. Москва ул. Кузнецкий мост, д.17, стр.1*

Создание биологического эквивалента костной ткани является важной проблемой в заместительной тканевой трансплантологии и ортопедии. Основу трансплантата костной ткани составляет синтетический матрикс и клеточный материал. В качестве матрикса можно использовать различные синтетические материалы: полимерные вещества или биокерамику. Наиболее удобным клеточным материалом для восстановления костных дефектов являются мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга. Этот материал является не только легкодоступным, но также удобен для культивирования и обладает уникальной способностью к цитодифференцировке в ткани мезенхимной природы, в частности, в клетки остеогенного ряда. Тем не менее, известно, что для более эффективного приживления созданного *in vitro* костного трансплантата, необходимо создать оптимальные условия для его васкуляризации. Таким образом, предваскуляризация костных трансплантатов является важным вопросом в тканевой инженерии и трансплантологии. В качестве материала для предваскуляризации нами были выбраны эндотелиальные клетки пупочной вены человека, которые могут быть легко выделены в достаточно большом количестве. В данной работе мы исследовали взаимовлияние двух клеточных популяций друг на друга *in vitro* и выбрали среду, в которой оба типа клеток успешно сокультивируются и дифференцируются при добавлении специфических индукторов. Так, ММСК костного мозга человека дифференцировались в клетки остеогенного ряда, а эндотелиальные клетки образовывали характерные сосудоподобные структуры. Кроме того, нами был разработан метод эффективной загрузки синтетического матрикса двумя типами клеток, при котором клетки были равномерно распределены внутри пористого материала.

Является ли обязательным присутствие в паренхиме головного мозга терапевтических НСК для проявления их нейротропного действия?

Лебедев С.В., Карасёв А.В. Волков А.И.

ФГУ «ГНЦ ССП им. В.П. Сербского», Росздрава, 119992 ГСП-2, Москва, Кропоткинский переулок, 23

Существующие гипотезы основываются на постулате о том, что для проявления нейротропных свойств терапевтических СК необходимо их присутствие в ткани повреждённого мозга. В многочисленных исследованиях показаны феномены миграции имплантированных СК в сторону очага повреждения нервной ткани, экспрессии нейротрофических факторов, активации неоангиогенеза, конститутивного нейрогенеза, обеспечивающих активацию собственных репаративных процессов в ЦНС. Продолжаются дискуссии о возможности замещения нервных клеток, утраченных вследствие патологического процесса, экзогенными СК с последующей их тканеспецифической дифференцировкой и встраиванием в нейрональные круги мозга реципиента. Вместе с тем, накоплен значительный экспериментальный материал, который даёт основание предполагать отрицательный ответ на поставленный в заглавии вопрос. Так, эффективность клеточной терапии, оцениваемая по восстановлению интегральных двигательных и когнитивных функций, существенно не различалась после внутримозгового, внутриликворного, внутриартериального, внутривенного и внутрибрюшинного введений СК при моделировании ишемического инсульта, перинатальных гипоксических и ишемических повреждений, травм головного и спинного мозга у крыс. Однако, количество экзогенных СК, обнаруженных авторами публикаций в паренхиме головного мозга таких животных могло различаться в десятки и сотни раз. Не выявлено и устойчивой связи уровня репарации при повреждениях ЦНС. с интенсивностью миграции, тканеспецифической дифференцировкой и видом СК, применявшихся с целью клеточной терапии.

Эти нередко противоречивые данные требуют экспериментальной проверки и, в первую очередь, необходимо верифицировать, действительно ли происходит функциональное восстановление на организменном уровне (интегральные показатели двигательных и когнитивных функций ЦНС) при заведомо минимальном проникновении в головной мозг имплантированных СК? Последнее можно создать, используя подкожный способ введения клеточных препаратов.

В наших собственных исследованиях установлено, что однократная подкожная имплантация крысятам нейральных стволовых клеток обонятельной выстилки человека (НСКовч) или прогениторных клеток эмбриональной нервной ткани крыс (ЭНТкр) в остром периоде перинатальных гипоксически-ишемических повреждений различной степени тяжести привела к существенному функциональному восстановлению, не менее эффективному, чем при внутримозговой имплантации клеточных препаратов. Не выявлено различий в эффективности имплантаций ксеногенных НСКовч и аллогенных клеток ЭНТкр. Поскольку имплантированные под кожу клетки в веществе головного мозга не обнаружены, можно предполагать, что механизмы лечебного действия экзогенных СК включают некие неизвестные дистанционные сигналы, опосредованно влияющие на репаративные процессы в ЦНС, по-видимому, через воздействие на общие регуляторные системы организма. Раскрытие природы таких сигналов может быть новым направлением в нейробиологии СК и в разработке клеточной терапии заболеваний и повреждений ЦНС.

Получение и анализ индуцированных плюрипотентных стволовых (иПС) клеток крысы

Лисковых М.¹, Чуйкин И.², Толкунова Е.¹, Минина Ю.³, Жданова Н.³, Раян А.², Бадер М.², Аленина Н.², Томилин А.¹

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

² *Центр молекулярной медицины им. Макса Дельбрюка, Берлин*

³ *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск*

Крыса представляет собой удобную модель в физиологии, фармакологии, трансплантологии, иммунологии, рака, старения, и изучении сердечно-сосудистой системы. При сравнимой с мышью продолжительностью репродуктивного цикла и стоимостью содержания, крыса имеет более подходящий размер для рутинного отбора проб крови и сложных физиологических опытов. С другой стороны, полное понимание физиологических процессов невозможно без описания функции генов, что в свою очередь должно опираться на генный нокаут (выключение функции гена за счёт внесения мутации в геномную ДНК). Проведение генного нокаута на крысе до недавнего времени не представлялось возможным, так как крысиные эмбриональные стволовые (ЭС) клетки были впервые получены только в 2008 году. Поми-

мо прочего, процесс их получения оказался очень трудоёмким и дорогостоящим. Недавнее описание феномена индуцированной плюрипотентности показало, что форсированная экспрессия 4-х транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, cMyc и Klf4) в эмбриональных фибробластах мыши (МЭФ) необходима и достаточно для запуска дедифференцировочных событий и превращения МЭФ в плюрипотентные клетки, называемые также индуцированными плюрипотентные стволовые (иПС) клетки, обладающие практически всеми известными свойствами ЭС клеток.

Таким образом, нами была поставлена задача получить и всесторонне охарактеризовать иПС клетки крысы, что в дальнейшем создаст предпосылки для проведения генного нокаута на этой удобной животной модели. Для этого, крысиные эмбриональные фибробласты (КЭФ) линии Sprague-Dawley одновременно заражались лентивирусами, кодирующими Oct4, Sox2, cMyc и Klf4 и, для визуального контроля, EGFP. Попытки получения иПС клеток крысы традиционными способами, применяемыми для мыши и человека, оказались безрезультатными. Исключение сыворотки и включение ингибиторов различных сигнальных путей: PD0325901 (MEK1/ERK), CHIR99021 (GSK3b) и A-83-01 (ALK5) позволило успешно достигнуть поставленной цели. Дальнейший клональный анализ полученных таким образом линий иПС клеток крысы показал, что CHIR99021 абсолютно необходим для выживания и поддержания плюрипотентности тогда как PD0325901 нужен для сдерживания эндодермальной дифференцировки. Полученные клоны иПС клеток крысы, которые имели типичную для ЭС и иПС морфологию, экспрессировали меркеры плюрипотентности (Oct4, Nanog и SSEA1), а также обладали нормальным кариотипом. Из генома полученных иПС клеток, путём временной экспрессии Cre-рекомбиназы, были выщеплены все 5 лентивирусов, что не выразилось в изменении кариотипа этих клеток. Далее, мы показали, что в геном иПС могут быть введены (методом электропорации) и поддерживаться в стабильном состоянии трансгены. В настоящее время ведется работа по достижению гомологичной рекомбинации в интересующих нас локусах генома полученных нами иПС клеток, что является необходимым условием для достижения конечной цели работы — проведения генного нокаута на на этой удобной для изучения ряда процессов животной модели.

Использование комбинаций плазмидных векторов для терапевтического ангиогенеза: исследование на мышинной модели ишемии

Макаревич П.И.¹, Цоколаева З.И.², Шевченко Е.К.², Шевелев А.Я.², Парфенова Е.В.¹

¹ *Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский пр-т, д. 31, к.5;* ² *Лаборатория ангиогенеза ИЭК РКНПК МЗСР РФ, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул., д. 15А*

Введение: Плазмидные векторы с генами факторов роста (VEGF, HGF, FGF-2) широко используются для терапевтического ангиогенеза, однако в настоящее время встал вопрос о возможности применения комбинаций факторов для повышения их эффективности.

Материалы и методы: Нами исследовалась ангиогенная эффективность ряда плазмид на базе оригинального вектора PC4W. Были созданы векторы с генами VEGF165, HGF, ангиопоэтина-1, урокиназы. Для работы использовались самцы мышей линии C57Bl/6J, у которых хирургически индуцировалась односторонняя ишемия задней конечности. Для исследования восстановления перфузии после введения одиночных плазмид или их парных комбинаций использовалась методика лазер-доплеровского исследования. После забоя животных на 21 день морфологическая оценка проводилась методом оценки плотности капилляров и сосудов после иммунофлуоресцентного окрашивания.

Результаты: Плазмиды с генами VEGF165, HGF и урокиназы показали свою ангиогенную активность *in vivo* по сравнению с контролями (пустой вектор PC4W или физраствор). Выявлен ряд эффективных комбинаций, применение которых позволяет повышать эффективность ангиогенной терапии: VEGF+HGF, VEGF+ангиопоэтин-1, HGF+ангиопоэтин. При введении указанных комбинаций перфузия ишемизированной конечности в конечной точке (по данным лазер-доплера) была выше, чем при введении одиночных плазмид или контрольных субстанций. Морфологический анализ показал, что при введении плазмид VEGF+HGF количество CD31+капилляров было выше, чем в группе одиночных векторов. Количество артериол, положительных по гладкомышечному актину, также оказалось выше в группе комбинации плазмид.

Выводы: Использование комбинаций плазмид PC4W с ангиогенными факторами роста позволяет добиться выраженного усиления реперфузии конечности, подтвержденного морфологически.

Фенотипическая пластичность клеток ретинального пигментного эпителия глаза человека *in vitro*

Милюшина Л.А., Александрова М.А.

Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, лаб. Проблем регенерации и Экспериментальной нейробиологии, Москва

Интенсивные исследования дифференцировки и пластичности стволовых клеток (эмбриональных и тканеспецифических), а так же создание индуцированных плюрипотентных клеток из соматических клеток, повлекли за собой новую волну интереса к проблемам де- и трансдифференцировки. В ЦНС клетки с прогениторными свойствами, подобные нейральным стволовым/прогениторным клеткам (СПК) мозга, обнаружены в глазу, которая, как весь мозг развивается из нейроэпителиальных клеток нервной трубки. Одни были обнаружены в пигментированных клетках цилиарного тела, в ретинальном пигментном эпителии (РПЭ) и в нейральной сетчатке. Особый интерес вызывают клетки РПЭ, которые у ряда позвоночных способны к пластическим изменениям и трансдифференцировке.

Наши исследования РПЭ показали, что на ранних стадиях развития глаза человека, РПЭ представляет собой гетерогенную популяцию клеток, отличающихся по адгезивным свойствам, миграции, способностям к трансдифференцировке и экспрессии маркеров плюрипотентного статуса. Клетки РПЭ глаза взрослого человека *in vitro* пролиферируют, мигрируют, депигментируются, приобретают веретенообразную форму, теряют маркеры исходной дифференцировки (RPE65, CRALBP) и экспрессируют маркеры, отвечающие за адгезию, клеточную миграцию и тканевую контракцию (FN, коллаген I типа, N-кадгерин, α -SMA). Экспрессия Oct4 и Pax6 свидетельствовала о дедифференцировке клеток в культуре.

Таким образом, наши предварительные данные свидетельствуют о том, что *in vitro* клетки РПЭ взрослого человека могут экспрессировать маркеры плюрипотентности, способны к пролиферации, миграции, изменению фенотипа и, наконец, к проявлению клетками пронеуральных свойств.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 08–04–00081; № 11–04–00510) и по контракту с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.512.12.2008.

Трансплантация костного мозга как способ лечения моногенных заболеваний на примере миодистрофии мышей mdx

Михайлов В.М., Соколова А.В., Каминская Е.В.

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Тихорецкий пр.4

Клеточная терапия направлена на возмещение ненормированных потерь клеток (ПК). ПК обычно возникают после действия внешних по отношению к клеткам-мишеням факторов. Другую группы составляют ПК из-за дефектов генов, в первую очередь, мутаций. ПК, развивающаяся из-за дефектов одного гена, вызывает гибель определенного типа клеток, которая приводит к заболеванию с характерными патологическими проявлениями. Такие заболевания классифицируют как моногенные (МГЗ). При МГЗ стволовые клетки (СК) являются хранителями мутантных генов, экспрессия которых происходит в дифференцированных клетках, сопровождаемая ПК. Отсюда вытекает различие методов клеточной терапии по отношению к указанным двум группам заболеваний. В первом случаи тактика клеточной терапии включает в себя компенсацию ПК. Идеальной клеточной терапией МГЗ является замена мутантных СК на СК дикого типа. Для терапии скелетных мышц при миодистрофии Дюшенна у человека и у животных, мышей mdx и собак, были апробированы трансплантации несколько линий клеток с прогениторными свойствами, выделенными из костного мозга, из мышц и других тканей. Ни в одном случаи не удалось превратить мутантные скелетные мышцы в мышцы дикого типа. По литературным и нашим данным замена мутантного костного мозга (КМ) на КМ дикого типа после Р-облучения мышей mdx в дозах 11, 7 и 5 Гр не усиливает синтез дистрофина из-за блокады транскрипционной активности трансплантированных ядер СК дикого типа. В наших опытах после Р-облучения в дозе 3 Гр у мышей-химер mdx синтез дистрофина возрастал от исходных 1.1 % до 4.1 % через 2 мес и до 27 % мышечных волокон через 6 мес. Воздействие магнитного ионного параметрического резонанса после приготовления мышей-химер mdx при Р-облучении в дозе 5 Гр усилило синтез дистрофина у 16 % мышечных волокон через 2 мес. Полученные результаты открывают новые возможности трансплантации КМ дикого типа для замены мутантного КМ как способа лечения моногенных заболеваний типа болезни Дюшенна.

Посттравматическая регенерация спинного мозга крысы при введении в область повреждения вектора рBud-VEGF+FGF2

Мухамедшина Я.О.

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии Казанского государственного медицинского университета, г.Казань, ул. Бутлерова, д.49.

На модели дозированной контузионной травмы спинного мозга крысы на уровне Т8 изучено влияние доставки генов VEGF и FGF2 на нейрорегенерацию. Проведено сравнение эффектов доставки терапевтических генов при помощи трансфицированных мононуклеарных клеток крови пуповины человека и путем прямой генной терапии. Трансфицированные геном EGFP клетки были выявлены на расстоянии не менее 10 мм от точки инъекции. Это свечение наиболее интенсивно на ранних сроках после травмы спинного мозга и введения клеток (2–6 суток), четко прослеживается на более поздних сроках (14–21 сутки) и постепенно затухает к 30 суткам. Показатель восстановления двигательной функции (BBB) при введении трансфицированных генами VEGF+FGF2 клеток возрастает на 40 % ($P < 0,05$), а при прямом введении рBud-VEGF+FGF2 в ту же область на 58 % ($P < 0,05$). На 30-е сутки после операции при введении трансфицированных клеток в наружных зонах белого вещества спинного мозга на расстоянии 1,5 см от эпицентра травмы количество периваскулярных клеток, экспрессирующих бета рецептор тромбоцитарного фактора роста (PDGFRbeta), увеличивается в среднем на 30 % ($P < 0,05$). При прямом введении плазмидного вектора этот показатель возрастает в среднем на 54 % ($P < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о том, что прямая доставка терапевтических генов VEGF и FGF2 в область повреждения более эффективно стимулирует посттравматическую регенерацию спинного мозга крысы.

Разработка условий культивирования клеток дермальной папиллы

Мягкова Е.П.,^{1,2} Воротеляк Е.А.²

¹МГУ им. М.В. Ломоносова; ²Институт биологии развития им. Кольцова, лаборатория проблем клеточной пролиферации. ул. Вавилова, д. 26

Дермальная папилла (ДП) — мезенхимный компонент волосяного фолликула, управляющий его формированием и циклом регенерации. Индуцирующие свойства клеток ДП снижаются при пассировании. Найти условия долгосрочного культивирования необходимо как для исследований в области эпителио-мезенхимных отношений, так и для медицинских целей. В данной работе тестировались широко употребляемые базовые среды для культивирования (DMEM и AlphaMax C-100) и некоторые белки, участвующие в эпителио-мезенхимных отношениях, добавление в среду которых приносило положительные результаты в других исследованиях. Мерой индуцирующих способностей являлась окраска на щелочную фосфатазу.

В ходе работы выяснилось, что обе базовые среды рационально использовать до 3 пассажа. На среде DMEM индуцирующие способности далее снижаются. На среде AlphaMax C-100 с 4 пассажа наблюдаются изменения в морфологии культуры, соответствующие дифференцировке.

Наиболее сильный эффект при добавлении оказали белки BMP6 и FGF2. Они увеличивали интенсивность окрашивания на щелочную фосфатазу на протяжении 3 пассажей. В отличие от них, витамин D обладал таким эффектом только на 1 пассаже.

Среда, кондиционированная кератиноцитами, продлевала индуцирующие способности культуры до 5 пассажа. Особенностями данной культуры являлись морфологические образования, псевдопапиллы, сформированные с разрывом пласта.

Полученные результаты будут способствовать дальнейшей разработке методов культивирования клеток ДП, а также позволят избежать ложных выводов, полученных в результате потери характерных свойств клеток ДП при культивировании.

Метод органотипического культивирования *in vitro* тканей глаза позвоночных животных как способ активации клеточных источников регенерации сетчатки глаза

Новикова Ю.П., Алейникова К.С., Григорян Э.Н.

Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН

У взрослых высших позвоночных и человека сетчатка обладает очень ограниченными возможностями для регенерации, что в заболеваниях, связанных с гибелью нейронов, приводит к необратимым изменениям, и, в итоге, слепоте. Это обуславливает постоянный интерес исследователей к клеточным резервам для восстановления сетчатки. Последние 10 лет ведется активный поиск клеточных источников для регенерации, локализующихся как внутри нейральной сетчатки, так и в других тканях глаза.

В попытке индуцировать пролиферацию и изменение фенотипа клеток в тканях глаза взрослых позвоночных мы использовали новый, оригинальный подход. Мы применили органное ротационное культивирование *in vitro* заднего сектора глаза без сетчатки и изолированной сетчатки, содержащей, в том числе и клетки периферии, претендующие на роль регенерационного резерва. Выбранный способ культивирования позволяет сохранять клеточное микроокружение близкое к таковому *in vivo*, осуществлять длительное культивирование, а также направленно манипулировать компонентами среды. Для сравнения пролиферативных возможностей клеток тканей глаза низших и высших позвоночных использованы два объекта — взрослые тритон и крыса, обладающие полярным потенциалом к изменениям дифференцировки и пролиферации клеток и регенерации в целом.

При культивировании сетчатки взрослого тритона *Pt. waltil* мы наблюдали активную миграцию клеток с периферии (зона *ora serrata*) вовнутрь сформированной сетчаткой в культуре сфероидов. Эти клетки, а также клетки отдельных популяций во внутреннем и наружном ядерных слоях сетчатки обладали митотической активностью. Ранее в экспериментах с длительной отслойкой сетчатки тритона *in vivo* и разных способах культивирования *in vitro* не удавалось регистрировать митозы в сетчатке, несмотря на обнаружение ДНК синтезирующей активности с помощью соответствующих маркеров. Митозы наряду с BrdU (маркер S фазы) — и PCNA (маркер S/G1 фазы) — позитивными клетками были выявлены в ростовой зоне и ядерных слоях сетчатки тритона. Активная пролиферация приводила к образованию большого пула малодифференцированных клеток,

способных к дальнейшим делениям, миграции и замещению погибших нейронов, в том числе фоторецепторов. Морфологические и иммунохимические исследования позволяют отнести пролиферирующие клетки сетчатки тритона как к прогениторным клеткам ростовой зоны, так и к клеткам макро- и микроглии и их потомкам. Маркирование анти-GFAP антителами указало на увеличение исходной популяции клеток Мюллера, а также на формирование *de novo* малого пула клеток с короткими GFAP положительными отростками. Изучение экспрессии маркера фоторецепторных клеток реCOVERина выявило его транслокацию из отростков в тела фоторецепторов, а также присутствие этого белка фототрансдукции в отдельных клетках внутри сфероида, предположительно в формирующихся *de novo* фоторецепторах.

При культивировании сетчатки взрослой крысы Вистар на фоне смещения клеток наружного ядерного слоя вовнутрь и их гибели, в сфероиде также имела место пролиферация. В наружной и внутренней областях сетчатки были обнаружены BrdU позитивные клетки и многочисленные митозы. Их источником, однако, не являлась периферия сетчатки. Делящимися были резидентные макрофаги, а также глиальные клетки, локализованные среди нейронов внутреннего ядерного слоя. При маркировании анти-GFAP антителами в сетчатке крысы, также как и у тритона, мы обнаружили возрастание числа GFAP-положительных волокон. Изучение экспрессии реCOVERина в культивированной сетчатке крысы указало на его транслокацию в перикарионы фоторецепторов и наружный сетчатый слой. При этом также как и в сетчатке тритона, дополнительно были выявлены клетки, предположительно, экспрессирующие этот белок *de novo*. Результаты свидетельствуют о том, что разработанный нами впервые подход оказался хорошим инструментом для активации клеток — возможных внутренних источников регенерации нейральной сетчатки у взрослых низших и высших позвоночных.

При культивировании заднего сектора глаза без нейральной сетчатки ретинальный пигментный эпителий (РПЭ), как тритона, так и крысы, не претерпевал макроморфологических изменений. При проведении сравнительного анализа морфологии, пролиферации и экспрессии клетками пан-нейральных маркеров выяснено, что клетки РПЭ взрослых тритона и крысы в сходных условиях *in vitro* имеют как сходства, так и отличие. Они обладают способностью к синтезу ДНК, но редко делятся митозом. При этом часть клеток РПЭ и тритона, и крысы вымещаются из слоя, мигрируют и приобретают фенотип макрофагов. Другие, каких большинство, сохраняют исходную морфологию, находясь в составе слоя. В ряде случаев

в этих клетках проявляются первые черты нейральной дифференцировки, а именно экспрессия пан-нейральных белков (VIII-тубулин, NF-200). Отличие клеток РПЭ тритона от таковых крысы выражается в проявлении способности формировать *in vitro* дополнительный ряд дедифференцированных, NF-200 позитивных клеток, так, как это происходит при регенерации сетчатки у тритона *in vivo*. Полученные данные свидетельствуют о том, что клетки РПЭ взрослых тритона и крысы сохраняют потенции к проявлению свойств ранней нейральной дифференцировки, однако более глубокие изменения на пути к специализации в клетки сетчатки присущи только РПЭ тритона.

В настоящее время разрабатываются подходы к направленной индукции регенераторных ответов клеток сетчатки и пигментного эпителия глаз позвоночных животных, с помощью добавленных в среду цитокинов и кондиционированных сред.

Новый участник JAK/STAT пути коактиватор транскрипции SAYP/ PHF10 важен для поддержания плюрипотентного статуса стволовых клеток

Панов В.В., Кузьмина Ю.Л., Шидловский Ю.В.

Институт Биологии Гена РАН, ул. Вавилова, 34/5, Москва 119334

Одним из важных путей передачи сигнала в клетке является JAK/STAT-сигнальный каскад. В настоящее время показана роль данного пути в регуляции многих важных процессов: миграции и дифференцировки клеток, апоптоза, а также в поддержании пролиферативного потенциала стволовых клеток взрослого организма.

SAYP — ранее открытый и описанный в нашей лаборатории транскрипционный фактор, важный для активации многих генов у *Drosophila melanogaster*. SAYP активирует транскрипцию посредством сборки большого белкового комплекса, объединяющего коактиваторы Brahma и TFIID. Фактор незаменим в развитии и присутствует в организме начиная с эмбриональной стадии. Мутации SAYP приводят к повышенной пролиферации ряда недифференцированных клеток. Гомолог SAYP у млекопитающих, фактор PHF10, важен поддержания плюрипотентного состояния стволовых клеток нервной системы развивающегося организма.

В нашей работе было показано, что SAYP взаимодействует с фактором STAT, конечным эффектором JAK/STAT пути. Также было продемонстри-

ровано, что наличие SAYP в клетке необходимо для активации STAT-зависимых генов. Показано привлечение SAYP на STAT-зависимые гены после их активации. Получены данные об участии SAYP в процессе транскрипции STAT-зависимых генов, а также последующих этапах процессинга мРНК. Мы предполагаем, что SAYP может играть важную роль в поддержании статуса стволовых клеток организма посредством участия в JAK/STAT-пути.

Модифицирующие эффекты мезенхимальных стволовых клеток на продукцию макрофагами активных форм кислорода в аллогенной и ксеногенной системах сокультур

Петров В.Н., Коноплянников, А.Г., Саяпина Е.В., Коноплянникова О.А., Лепехина Л.А., Кальсина С.Ш., Семенкова И.В., Агаева Е.В.

Медицинский радиологический научный центр РАМН, г. Обнинск

В настоящее время доказано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают уникальными иммуномодулирующими свойствами, среди прочих проявлений которых является их способность ослаблять активность эффекторных клеток кроветворной и иммунной систем при трансплантации в аллогенный и ксеногенный организм. Благодаря этому МСК избегают аллогенного отторжения, как у людей, так и в экспериментальных моделях (Aggarwal S., Pittenger M. F., 2005; Ryan J. M. et al., 2005). Эти свойства МСК костного мозга человека расширяют возможности их клинического применения (Barry F. P., Murphy J. M., 2004; Koch T. G., 2009). Выяснению основных механизмов иммуномодулирующего действия МСК посвящены многочисленные экспериментальные исследования по совместному культивированию МСК и эффекторных клеток иммунной системы (субпопуляции Т — и В-лимфоцитов, НК-клеток — естественных киллеров, ДК — дендритных клеток, макрофагов и т. д.), результаты которых систематизированы в ряде обзорных статей (Le Blanc K. et al., 2003; Le Blanc K., Ringden O., 2005; Chamberlain G. et al., 2007; Guo Z. et al., 2006; Ryan J. M. et al., 2005; Sotiropoulou P. A. and Papamichail M., 2007). Тем не менее, механизмы, лежащие в основе МСК-супрессивного эффекта, до конца не ясны. Благодаря *in vitro* исследованиям с совместным культивированием клеток (МСК и эффекторных клеток) сложилось представление о зависимых и независимых от клеточных контактов механизмах МСК-супрессии. Важную

роль в них играют процессы модулирующего воздействия МСК на цитокиновую продукцию эффекторных клеток-макрофагов. В частности, установлено снижение продукции ИФН- γ , ИЛ-12 и ФНО- α , которые играют центральную регулируемую и провоспалительную роль в цитокинопосредованном иммунитете (Aggarwal S., Pittenger M. F., 2005). Существенно снижена экспрессия CD206 — маркера альтернативно активированных макрофагов (Martinez F. O. et al., 2008) на фоне повышенной экспрессии ИЛ-6 и ИЛ-10 у моноцитов, выделенных из периферической крови здоровых доноров, в сокультуре с МСК костномозгового происхождения (Kim J., Nematti P., 2009). Однако, наряду с цитокинами к числу активных медиаторов межклеточных взаимодействий относят также активные формы кислорода, продуцируемые НК и ДК, моноцитами крови, тканевыми макрофагами и др. (Владимиров Ю. А., Шерстнев М. П., 1989; Маянский А. Н., Маянский Д. Н., 1989; Славина Е. Г., 1984; De Beetselie P. and Schram E., 1986; Martin J. H., Edwards S. W., 1993). Причем, если ответная реакция в форме выработки ФНО- α клетками-эффекторами развивается максимально через 30–40 минут, то механизмы продукции активных форм кислорода (АФК) запускаются моментально (в первые секунды) после индуцирующего воздействия тех или иных факторов. Вместе с тем, вопросы, касающиеся возможной модификации уровня продукции АФК макрофагами при совместном культивировании с МСК или в условиях *in vivo* трансплантации, в литературе практически не освещены.

В хемилюминесцентном тесте нами оценено *in vitro* модифицирующее воздействие мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга здоровых доноров, мышей, крыс и фетальных МСК человека, а также их кондиционированных сред (КС) на продукцию активных форм кислорода (АФК) моно — и полиморфнонуклеарами крови человека и перитонеальными макрофагами мышей. Использовали две системы смешанных культур: МСК и макрофаги во взвеси, а также инкубацию взвеси макрофагов на монослое МСК (при соотношении МСК/макрофаги от 2:1 до 1:16). Установлено, что МСК и их КС существенно ингибируют продукцию АФК макрофагами. Степень ингибирования зимозан-индуцируемой хемилюминесценции (ХЛ) эффекторных клеток-макрофагов большей частью зависит от количественного соотношения ПМ/МСК *in vitro* системе и практически не зависит от генотипа смешиваемых клеток (аллогенные и ксеногенные их соотношения). КС также обладали дозо-зависимым ингибирующим воздействием на ХЛ-активность макрофагов. Реализация макрофагами таких важных функций, как фагоцитоз и цитотоксические эффекты, направленные на элиминацию трансформированных или трансплантированных алло-

генных клеток, связано в том числе с усилением продукции АФК. Можно предположить, что выявленный нами механизм ингибирования продукции АФК является одним из самых ранних звеньев модуляции супрессивного микроокружения трансплантируемых аллогенных МСК в организме. Почти аналогичная картина МСК-ингибирования продукции отдельных цитокинов описана в литературе для *in vitro* систем смешанных культур. Вероятно, развитие стойкой и длительной ремиссии разнообразных нозологических форм аутоиммунных заболеваний (таких как ревматоидный артрит, язвенный колит, болезнь Крона, рассеянный склероз, системная красная волчанка, склеродермия и т. д.) после проведения аллогенной и аутологичной трансплантации МСК достигается благодаря перечисленным механизмам ингибирования цитокиновой и АФК продукции эффекторными клетками и, следовательно, развитием, в целом, противовоспалительного статуса в организме пациента.

Опыт работы низкотемпературного банка аутологических и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине

Прокопюк В.Ю., Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Чижевский В.В.

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины
ГП «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН, МОЗ Украины» Украина, г. Харьков, ул. Переясловская, 23.*

Большой мировой научный, экспериментальный и клинический опыт использования препаратов плацентарного происхождения делает реальным широкое применение их в регенеративной медицине. Однако клиническое применение ставит перед исследователями и клиницистами ряд вопросов, требующих решения. Острые дискуссии разворачиваются вокруг вопроса — что может быть источником биоматериала? Актуальны в этой проблеме аспекты биоэтики, биобезопасности, требований к их производству, долгосрочного хранения и оценки качества. Принципиальным является степень востребованности препаратов и легитимности клинического применения.

В работе рассмотрен наш опыт решения этих вопросов на основании более чем 30 лет теоретических и клинических исследований.

Наиболее приемлемым источником биоматериала, по нашему мнению, может быть плацента, оболочки, плацентарная кровь, полученные в родах

от здоровых женщин. Важным аспектом является то, компоненты кордовой крови, фрагменты, суспензии, экстракты плаценты и плодных оболочек содержат структуры раннего онтогенеза, стволовые клетки и их микроокружение, клетки-предшественники практически всех тканей человека, ростовые и регуляторные соединения, что делает препараты плацентарного происхождения средством выбора в регенераторной медицине. В то же время материал является утильным, заготовка его безопасна для матери и новорожденного. Информированное согласие матери на забор материала обязательно. Следует отметить, что востребованным является как донорский, так и аутоматериал для длительного хранения. Требования к биобезопасности прописаны в правилах обследования донорских препаратов каждого государства. В производстве должны быть использованы только оборудование и препараты, разрешённые к клиническому применению. Для применения обязательно лицензирование производства и сертификация препаратов, которые подходят под категорию иммунобиологических, либо компонентов донорской крови. Хранение препаратов, обеспечивающее карантинизацию, время для обследования, а значит, — безопасность, возможность применения аутопрепаратов через десятки лет, может быть обеспечено только в условиях низкотемпературного банка. Выполнение выше перечисленного дало нам возможность применять плацентарные препараты с высокой эффективностью в регенеративной медицине.

Устойчивость кератиноцитов к низким температурам в условиях *in vitro*

Райдан М.М., ¹Шубин Н.А., ¹Блинова М.И., ²Прохоров Г.Г., ¹Пинаев Г.П.

¹ *Институт цитологии РАН и* ² *Международный институт крио-медицины, Санкт-Петербург; ¹электронный адрес: raydanmazen@yahoo.com*

В косметологии существует метод омоложения кожи путем воздействия на нее парами жидкого азота. Предполагается, что верхний слой эпидермиса кожи более чувствителен к воздействию низких температур по сравнению с клетками, находящимися в нижнем слое эпидермиса и способными к регенерации кожи. Нами проведено исследование влияния низких температур на культивируемые кератиноциты. С использованием программного замораживателя кератиноциты подвергали действию низких температур в диапазоне от -10°C до -70°C в составе цельных биоптатов кожи (с последующим выделением кератиноцитов), в виде суспензии кератиноцитов или в виде клеточного осадка после центрифугирования суспензии. После процедуры охлаждения клетки высевали, оценивали их жизнеспособность по адгезии к субстрату, затем анализировали с помощью антител против кератинов 19, 14, 10 состояние гетерогенных популяций кератиноцитов, подвергшихся охлаждению в разных режимах. Воздействие низких температур оценивали по морфологии (наблюдения под инвертированным микроскопом) и соотношению в популяциях клеток с разной степенью дифференцировки методом конфокальной микроскопии. Результаты показали, что клетки в зависимости от стадии их дифференцировки имеют разную степень устойчивости к низким температурам. Кератиноциты базального слоя (стволовые и транзиторные) являются более устойчивыми к такому воздействию по сравнению с дифференцированными из супрабазальных слоев. Устойчивость кератиноцитов к воздействию на них низкими температурами зависела от того, в каком состоянии они подвергались охлаждению. Базальные кератиноциты в составе цельного биоптата выдерживали температуру до -70°C , в осадке — до -50°C , наименее устойчивыми оказались клетки в суспензии (выдерживали не более -40°C). Результаты исследования представляют интерес и для клеточной биологии в качестве основы селекции культивируемых кератиноцитов, используя их различную устойчивость к низким температурам.

Влияние мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на воспалительный ответ при пиелонефрите

Рогачева Н.В., Плотников Е.Ю., Певзнер И.Б., Янкаускас С.С., Зоров Д.Б.

НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

Современные методы терапии пиелонефрита часто оказываются малоэффективными, поэтому интенсивно ведутся исследования альтернативных методов лечения. Одним из современных направлений в таких исследованиях является использование различных типов стволовых клеток.

В работе у крыс моделировали острый пиелонефрит путем введения в мочевою пузырь суспензии фекальных бактерий. На этой модели изучали влияние внутривенного введения культуры мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) на воспалительный ответ и повреждение почки.

У животных наблюдали развитие инфекционно-воспалительного процесса: увеличение концентрации лейкоцитов в моче и крови, сдвиг лейкоцитарной формулы крови вправо. При этом происходила активация лейкоцитов крови, что выражалось в повышении генерации ими активных форм кислорода (АФК). Результатом этого явилось развитие окислительного стресса в тканях почки: повышение уровня малонового диальдегида (МДА).

При введении ММСК наблюдали снижение выраженности воспалительного процесса: количество лейкоцитов в моче снижалось в среднем с 70 до 0 кл/мкл, уменьшалось число нейтрофилов и генерация АФК лейкоцитами. Введение ММСК также уменьшало окислительное повреждение ткани почки, уровень МДА снижался до контрольных значений.

Таким образом, выявлено иммуномодулирующее действие ММСК, снижающее воспалительное повреждение ткани почки при пиелонефрите.

Поддержано грантами РФФИ # 08–04–01667 и 09–04–13663

Роль эпидермального фактора роста в поддержании жизнеспособности заднего эпителия роговицы при консервации

Розинова В.Н., Баранов П.Ю.

НИИ глазных болезней РАМН 119021, г.Москва, ул. Россолимо, д. 11А и Б

Актуальность. Несмотря на прогресс регенеративной медицины в использовании различных клеток-прогениторов и тканеинженерного подхода в усилении регенерации различных органов и тканей, сквозная кератопластика остается единственным эффективным методом восстановления дефектов роговицы глаза. Лимитирующим фактором при заготовке и консервации донорского материала является функциональное состояние заднего эпителия роговицы (ЗЭР). Клетки-предшественники ЗЭР выделены и описаны как для взрослых, так и для фетальных роговиц человека, однако их культивирование и трансплантация сопряжены с рядом ограничений, в т.ч. структурированием и формированием межклеточных контактов. Альтернативный путь — повышение жизнеспособности ЗЭР в жидкой питательной среде при консервации за счет добавления биологически активных факторов.

Цель работы. Оценить эффективность эпидермального фактора роста в повышении жизнеспособности заднего эпителия роговицы при консервации.

Материалы и методы. Донорские роговицы человека консервировали в стерильных условиях во флаконах со средой 1 (А-среда — жидкая питательная среда с адгелонем) или средой 2 (А-среда с добавлением ЭФР) при $t=4$ °С. Оценку состояния ЗЭР проводили на инвертированном микроскопе Axiovert 25 (Carl Zeiss) в фазово-контрастном освещении, не извлекая роговицу из емкости на 1,4,7 и 10 день после консервации. Критериями морфометрической и морфологической оценки служили стабильность, гомогенность, плотность клеток ЗЭР и процент гексагональных клеток.

Результаты. При хранении роговиц в обоих типах сред на 1, 4, и 7 день разница параметрических характеристик была незначительной. На 10 день консервации потеря клеток ЗЭР в первой группе была выше, по сравнению со второй (2,1 % и 1,83 %, соответственно); к 7 и 10 суткам хранения показатель гексагональности клеток в среде 1 был существенно снижен по сравнению со средой 2 (7,15 % и 21,5 % соответственно).

Полученные данные указывают на то, что эпидермальный фактор роста повышает жизнеспособность и функциональное состояние ЗЭР при консервации.

Заключение. Поддержание жизнеспособности и структурной и функциональной целостности заднего эпителия роговицы при консервации с помощью эпидермального фактора роста позволяет существенно продлить сроки хранения донорских роговиц.

Фармакологическая защита трансплантата роговицы гомологичными клеточными пептидами на этапе нормотермической и гипотермической консервации

Ролик О.И., Борзенко С.А., Онищенко Н.А.* , Комах Ю.А.

ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмед-технологии». Россия, Москва, 127486, Бескудниковский бульвар, д. 59А, Тел.: 488-84-05

**ФНЦ Трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И.Шумакова.*

Актуальность. После сквозной кератопластики происходит замещение всех структур донорской роговицы клетками и тканями роговицы реципиента, кроме клеток заднего эпителия (эндотелия), которые продолжают жить, обеспечивая жизнедеятельность всего трансплантата. Эндотелиальные клетки (ЭК) роговицы, будучи глиального происхождения и находясь в высоко-дифференцированном состоянии, в постэмбриональном периоде прекращают митотическое деление.

Цель. Анализ результатов морфофункциональной сохранности эндотелиальных клеток сквозных трансплантатов донорских роговиц при среднесрочной консервации в двух режимах — нормотермического (при +37°C) и гипотермического (при +6°C) культивирования с использованием препарата NeyDIL № 37 «Cornea» (Р/У ЛРС-008827/08–061108), содержащего регуляторные пептиды из клеток роговиц фетальных и ювенильных животных.

Материалы и методы. Две опытные группы состояли из трупных донорских роговиц по 10 в каждой, две контрольные — из 20 от тех же доноров. В среды опытных групп перед консервацией или заменой вводился препарат NeyDIL №37 до конечной концентрации 1 мкг/мл. Сроки органного культивирования составляли 8, 16 и 21 сут; гипотермического — 3, 6, 9 сут. Плотность ЭК подсчитывалась рутинным способом и автоматически с помощью кератоанализатора. Проводились электронно-микроскопические исследования ультраструктурной сохранности ЭК в вышеуказанные сроки консервации.

Результаты. За 21 сут органного культивирования потеря ЭК в опытной группе составила 6,1 %, в контрольной — 9,7 %. За 9 сут гипотермического культивирования потеря ЭК в опытной группе составила 5,1 %, в контрольной — 7,2 %. В те же сроки в образцах роговиц опытных групп

отмечались схожие и незначительные изменения в ультраструктурной архитектонике ЭК; в контрольных образцах при тех же сроках отмечались повышенная внутриклеточная гидратация и деструктуризация митохондриальных мембран, явления паренхиматозной дегенерации ЭК.

Выводы. Препарат NeyDIL №.37 оказывал выраженное защитное действие на плотность и архитектонику ЭК донорских роговиц в процессе их консервации в обоих режимах. При выборе способа консервации донорских роговиц для среднесрочного хранения предпочтение следует отдавать гипотермическому культивированию в среде Борзенка-Мороз с использованием препарата NeyDIL №.37, как более дешевому и менее трудоемкому.

Культивирование сперматогенных клеток хряка на фидерном слое в присутствии LIF /DIA

Савченкова И.П., Викторова Е.В.

*ГНУ НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко,
109428 Москва, Рязанский пр-т, 24/1, s-ip@mail.ru*

Накапливаются данные, свидетельствующие о получении из сперматогенных стволовых клеток мыши и человека полипотентных клеток с фенотипом подобным эмбриональным стволовым (ЭСК). Многие вопросы, касающиеся молекулярных и клеточных механизмов, способствующих такой трансформации, остаются не выясненными, а в отношении сперматогенных клеток хряка отсутствуют. Целью наших исследований было изучить влияние фактора, ингибирующего лейкемию или активность дифференцировки (LIF/DIA) на сперматогенные клетки хряка в культуре. В эксперименте использовали клетки, выделенные нами ранее из тестикул 60–80 сут хряков. Наличие в культуре стволовых сперматогенных клеток было подтверждено функциональным тестом. В качестве фидерного слоя использовали клетки эмбриональных фибробластов мыши (STO), обработанные митомицином С. Клетки печени Buffalo крысы (BRL) использовали для приготовления кондиционированной среды, содержащей LIF/DIA. Среда, используемая для культивирования ЭСК мыши, была базовой. Анализ щелочной фосфатазы проводили с помощью набора (Sigma). Результаты проведенных исследований показали, что фидерный слой STO способствуют поддержанию в культуре сперматогенных клеток. На 7–10 сут наблюдали формирование клеточных колоний, в которых плотно упа-

кованные, мелкие клетки были не активны по щелочной фосфатазе. Клонирование этих клеток на новые фидерные слои приводило к сохранению их фенотипа. Добавление же в ростовую среду кондиционированной среды, способствовало образованию колоний, в течение 3–4 нед, которые имели морфологию подобную ЭСК и отличались высокой активностью щелочной фосфатазы. Таким образом, можно предположить, что наличие фидерного слоя и LIF/DIA в культуре оказывают влияние на сперматогенные клетки хряка и способствуют формированию колоний клеток с фенотипом, подобным ЭСК.

Работа поддержана грантом РФФИ 10–04–01471-а.

Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза

Салафутдинов И.И.¹, Кудряшова Н.В.¹, Шафигуллина А.К.²,
Ланник Н.И.¹, Исламов Р.Р.², Ризванов А.А.^{1,2}

¹ *Казанский (Приволжский) федеральный университет*

² *Казанский государственный медицинский университет, Казань
Россия*

E-mail: sal.ilnur@gmail.com

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся гибелью мотонейронов коры головного мозга, ядер ствола и спинного мозга, клинически проявляющейся параличом скелетной мускулатуры. Одна из причин гибели нейронов, в случае семейной формы заболевания, обусловлена доминантными точечными мутациями в виде замены аминокислоты глицин на аланин в 93 позиции гена супер-оксид дисмутазы 1 (SOD1), кодирующего Cu/Zn — супероксид дисмутаза, — одного из ключевых ферментов антиоксидантной защиты клетки. На сегодняшний день не существует адекватных методов лечения БАС. Одним из перспективных методов лечения больных, страдающих данным заболеванием, может выступить, трансплантацией генетически модифицированных стволовых клеток.

В качестве модельного объекта были использованы трансгенные мыши линии B6SJL-Tg (SOD1-G93A) dl1Gur/J экспрессирующие фенотип БАС. При начальной стадии болезни (24–28 недель); животным ретробитально вводили мононуклеарную фракцию пуповинной крови человека трансфицированную плазмидными векторами экспрессирующими EGFP (конт-

рольная группа) или рBud-VEGF165-FGF2 (опытная группа). Увеличение экспрессии мРНК терапевтических генов подтверждали ПЦР в реальном времени, составило 200000 и 20000 раз VEGF и FGF2 соответственно.

В ходе анализ спинного мозга мыши, спустя 14 дней после введения клеток, выявили присутствие трансплантированных EGFP флуоресцирующих клеток. В обеих группах иммуногистохимически обнаружили миграцию трансплантированных HNA-позитивных клеток, которые проявляли фенотип CD34- и Iba1-позитивных клеток, и были отрицательными в отношении OSP и нейронального β III-тубулина. Только в группе с введением трансфицированных рBud-VEGF165-FGF2 клеток выявили S100-позитивные клетки.

Разработка клеточного продукта с использованием стромальных клеток костного мозга для восстановления хряща в зоне роста трубчатых костей

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

¹Санкт-Петербургский Политехнический Университет, СПб, ул. Политехническая, 29; ²Институт Цитологии РАН, СПб, Тихорецкий пр., 4

В настоящее время в ортопедии существует проблема восстановления хряща в зоне роста трубчатых костей у детей. При травматическом повреждении зоны роста кости происходят серьезные нарушения не только хондрогенеза, но и остеогенеза, в результате чего прекращается рост кости в области повреждения. Для восстановления хряща используется пересадка аутологичных хондроцитов, которые получают из биопсий неповрежденного хряща. Взятие биопсии приводит к дополнительному повреждению хрящевой ткани, которая медленно восстанавливается. В связи с этим представляется перспективным использование стромальных клеток костного мозга (СККМ) в восстановлении хрящевой ткани в зоне роста кости. Кроме того, актуальна проблема создания продукта, который можно было бы ввести в рану и который бы дифференцировался в нужном, хондрогенном, направлении.

Невозможность введения суспензии клеток в рану обусловлена существованием внутритканевого давления. В связи с этим целью нашего исследования явился подбор носителя для клеток, который позволил бы стабильно

лизировать клетки в ране. По данным литературы для этой цели используются биodeградируемые матриксы на основе коллагена. На первом этапе в качестве носителя мы использовали гемостатическую коллагеновую губку (ГКГ). При нанесении клеток на ГКГ клетки погибают, т. к. в губке содержится большое количество токсичных веществ. Для снижения токсичности губку её отмывали водой или PBS в течение 2-х суток. После такой обработки клетки распластаются и пролиферируют на пластике вокруг губки, но после пересева не остаются жизнеспособными. На следующем этапе был использован коллагеновый гель. По скорости полимеризации и консистенции лучше всего подошёл гель 3.0 мг/мл. При культивировании в нем клеток, через сутки начинается контракция — сжатие геля клетками, что придаёт ему дополнительную прочность. Таким образом, был получен клеточный продукт, который можно ввести в рану без вытеснения. При этом введённые клетки должны дифференцироваться в хондрогенном направлении при условии, что их вводят в рану, окружённую в основном костными клетками. Для этого СККМ в течение трёх суток культивировали в виде микромасс в дифференцировочной среде. В результате проведённых нами исследований удалось получить клеточный продукт, который можно поместить в рану и который будет дифференцироваться в хондрогенном направлении. Данный продукт в настоящее время используется для изучения восстановления зоны роста повреждённых трубчатых костей у кроликов.

Испытание тканеинженерного биodeградирующего графта в качестве протеза кровеносного сосуда *in vivo*

Севостьянова В.В.¹, Elgudin Y.L.², Wnek G.³, Emancipator S.², Lubysheva T.³, Pinault G.C.², Abdalla M.A.², West D.M.², Барбараш Л.С.¹

¹ НИИ комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний СО РАМН, г. Кемерово, Россия.

² Case Western Reserve University, Department of Surgery, Cleveland VA Medical Center, Cleveland, OH, USA.

³ Case Western Reserve University, Department of Macromolecules Science and Engineering, Cleveland OH, USA.

Высокая потребность сердечно-сосудистой хирургии в сосудах мелкого диаметра (<6 мм) делает весьма перспективной разработку тканеинженерных кондуитов. Целью работы явилась оценка *in vivo* полимерного биодер-

гадирующего графта в качестве протеза кровеносного сосуда.

Материалы и методы. Сосудистые графты (внутренним диаметром 2 мм, толщина 100 мкм) из биodeградирующего полимера поликапролактона (poly (caprolactone), PCL) ($M=80.000$), были изготовлены методом электроспиннинга (10 % раствор PCL в хлороформе, напряжение на игле — +15 кВ, скорость потока раствора — 1мл/ч, расстояние между иглой и коллектором — 15 см, коллектор — штифт диаметром 2 мм). Пять самцов крыс линии Wistar (400–450г) были прооперированны под ингаляционным наркозом 1 % изофлурана. PCL-графт имплантировали в брюшную аорту между почечной артерией и бифуркацией аорты с использованием нейлона 9–0. После снятия зажимов ток крови через графт оценивали с помощью доплерографии. Через 6 недель животных выводили из эксперимента. Состояние анастомоза и самого графта оценивали по гистологическим препаратам с окраской гематоксилин-эозин, Маллори и Ван-Гизон.

Результаты. При гистологическом исследовании в просвете графта и зонах анастомозов был выявлен сплошной слой неоинтимы. Внутренняя поверхность графта была покрыта эндотелиальными клетками, большинство которых имело увеличенные гиперхромные ядра и уменьшенный ядерно-цитоплазматический индекс по сравнению с эндотелиальными клетками собственной аорты. Графт был инфильтрирован клетками с морфологическими признаками миофибробластов и макрофагов. Участки накопления коллагена, богатые гликозаминогликанами, ламинином и фибронектином, были выявлены по всей толщине и длине графта. При макроскопической оценке имплантированного кондуита в периваскулярной ткани не было обнаружено признаков кровотечения.

Таким образом, проведенное исследование показало образование структур на PCL-графтах, характерных для кровеносного сосуда, что делает PCL перспективным материалом для дальнейшего поиска путей его использования.

Поведение трансплантированных стволовых клеток в составе органотипической эксплантационной культуры сетчатки глаза

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

¹МГУ им. М.В.Ломоносова; ²НИИ Общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва, Россия. Ленинские горы д.1 к.12, embryossa@gmail.com

Культивирование сетчатки проводили в стандартных условиях (DMEM/F12 с 20 нг/мл FGF и EGF, 7 % FCS, гепарином, добавками B12 и N2). На 7-е сутки эксплантаты повреждали лазером Zilos-tk (300 мВт 1000 мс) по квадрату со стороной 100 мкм (15 импульсов), и трансплантировали ММСК и НСПК из красного костного мозга большеберцовых костей и субвентрикулярной зоны мозга GFP+ мышей соответственно в концентрации 300–300000 клеток в 0,2 мкл.

Было показано, что НСПК и ММСК активно мигрировали в первые сутки после трансплантации к области повреждения (достоверное отличие ($p < 0,05$) от эксплантатов без травмы) с расстояния более 3-х мм, образовывали нейриты и связи с клетками реципиента и сохранялись до 50 суток в месте травмы. При трансплантации единичных НСПК — они образовывали ассоциаты и хаотично мигрировали в эксплантате, в процессе дифференцировки приобретали глиальный фенотип. Единичные трансплантированные ММСК не сохранялись в сетчатке более 3-х суток. При исследовании распределения трансплантированных НСПК в эксплантате с несколькими зонами лазерного повреждения, на расстоянии от места инъекции 600 мкм, 1000 мкм и 3000 мкм, было показано заселение трансплантированными НСПК всех зон повреждения через 7 суток после инъекции в соотношении 90 %, 56 % и 27 % соответственно. И нахождение GFP+ ММСК в ближайшей к месту инъекции зоне повреждения. Таким образом, удалось детально проследить судьбу ММСК и НСПК при трансплантации в нейросетчатку глаза, показать решающую роль клеточного окружения для направленной дифференцировки и миграции трансплантата, показать временную и пространственную зависимость эффективности миграции клеток в область повреждения, оценить минимальное количество клеток, способное мигрировать на большие расстояния в область травмы.

Работа выполнена при реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы.

Дифференцировка регенерация скелетных мышц мышей mdx после трансплантации стволовых клеток костного мозга

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

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4.

Исследования возможности использования стволовых клеток костного мозга для клеточной терапии мышечной дистрофии Дюшенна, возникающей в результате мутации гена белка дистрофина, проводятся, в основном, на модели данного заболевания — мышцах mdx, для которых характерны повторяющиеся циклы дегенерации — регенерации поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ). В работе исследовалось влияние внутривенной трансплантации стволовых клеток костного мозга дикого типа на дифференцировку и регенерацию ППМВ мышцей mdx. Мышей mdx подвергали рентгеновскому облучению в дозе 3 или 5 Гр, затем им трансплантировали клетки костного мозга (ККМ) трансгенных мышцей C57BL/6, экспрессирующих зеленый флуоресцирующий белок (GFP). Через 2 мес после внутривенной трансплантации ККМ мышцам mdx, облученным в дозе 5 Гр, GFP-положительные клетки присутствовали в различных органах, в частности костном мозге и скелетных мышцах. В мышцах также были обнаружены GFP-положительные ППМВ, свидетельствующие об участии трансплантированных клеток в регенерации ППМВ. При этом не наблюдалось усиления синтеза дистрофина, что согласуется с литературными данными о незначительном нарастании доли дистрофин-положительных ППМВ у мышцей mdx после облучения летальными дозами ионизирующего излучения и трансплантации ККМ. В мышцах радиационных химер mdx, полученных путем трансплантации ККМ мышцам mdx, облученным в дозе 3 Гр, также присутствовали GFP-положительные ППМВ. Кроме того, нарастала доля дистрофин-положительных ППМВ, достигая через 6 мес после трансплантации $27,6 \pm 6,7\%$, что сопровождалось снижением доли погибших ППМВ и увеличением доли ППМВ без центрально расположенных ядер. Таким образом, трансплантированные внутривенно облученным мышцам mdx ККМ, участвуют в регенерации ППМВ и приводят к усилению дифференцировки ППМВ мышцей mdx.

Проблема безопасности и обоснованности риска пациента в регенеративной медицине в системе обязательного медицинского страхования

Старченко А.А., Зинланд Д.А., Третьякова Е.Н., Тарасова О.В., Фуркалюк М.Ю., Комарец С.А., Курило И.Н., Гончарова Е.Ю., Гуженко М.Д.

Общественный совет по защите прав пациентов при Росздравнадзоре, г. Москва, Россия; Росгосстрах-Медицина, г. Москва; ГУЗ «МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского», г. Москва, ул. Киевская, 7; medadvokat1@mail.ru

Цель: упорядочение терминологии по проблеме безопасности пациентов в регенеративной медицине, информирование о правилах правового регулирования безопасности пациентов и обоснованности риска при использовании клеточных технологий в системе обязательного медицинского страхования.

Статья 238 Уголовного Кодекса РФ устанавливает ответственность за оказание услуг, не отвечающих требованиям безопасности жизни или здоровья потребителей, которая предполагает наказание штрафом в размере до трехсот тысяч рублей или лишением свободы на срок до двух лет; при причинении тяжкого вреда здоровью или смерти пациента — лишением свободы на срок до шести лет: при причинении по неосторожности смерти двум или более лицам — лишением свободы на срок от четырех до десяти лет. Статьей 7 Закона РФ «О защите прав потребителей» установлено право потребителя на безопасность услуги.

Медицинское вмешательство — воздействие на человека медицинскими средствами и методами, разрешенными к применению в установленном законом порядке, и направленными на достижение положительного результата в области профилактики заболеваний, обследовании состояния здоровья, диагностики, лечения, ухода и реабилитации в связи с возможными заболеваниями, имеющимися заболеваниями, иными расстройствами здоровья, беременностью и родами. Источник повышенной опасности — деятельность, осуществление которой создает повышенную вероятность причинения вреда из-за невозможности полного контроля за ней со стороны человека (ст. 1079 ГК РФ, Постановление Пленума Верховного Суда РФ № 3 от 28.04.1994 г.).

Безопасность медицинского вмешательства — отсутствие необоснованного риска при допущении обоснованного риска медицинского вмешательства, выполняемого по показаниям в соответствии с имеющимся заболева-

нием с учетом противопоказаний к вмешательству или с диагностической целью. Риск медицинского вмешательства — вероятность наступления неблагоприятного исхода для жизни или здоровья пациента, а также вероятность недостижения той цели, ради которой проводится медицинское вмешательство; оценивается экспертом: а) по наличию объективных и субъективных условий для возникновения неблагоприятного исхода или недостижения поставленной цели медицинского вмешательства; б) по выполнению объема и качества профилактических мер неблагоприятного исхода и недостижения цели медицинского вмешательства.

Предусмотренная Законом «О медицинском страховании граждан в РФ» обязанность выполнения экспертизы качества медицинской помощи, включает применение финансовых санкций к учреждению здравоохранения при выявлении дефектов организации и оказания медицинской помощи с использованием клеточных технологий:

1. Отсутствие лицензии на вид деятельности «применение клеточных технологий», уст. постановлением Правительства РФ от 22.01.07 г. № 30.

2. Отсутствие разрешения Росздравнадзора на использование конкретной клеточной технологии (приказ МЗ и СР РФ от 20.07.07 г. № 488). В соответствии с Основами законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан (статья 43) в практике здравоохранения возможно использовать только разрешенные к применению методы профилактики, диагностики и лечения. Государственный Реестр новых медицинских технологий является официальным документом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации и Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения и социального развития, представляет собой аннотированный перечень утвержденных, зарегистрированных и разрешенных к применению в медицинской практике способов профилактики, диагностики, лечения и методов организационной формы работы.

3. Несоответствие использования клеточных технологий требованиям приказа МЗ и СР РФ от 25.05.07 г № 357/40: — перечню тканей человека — объектов трансплантации; — перечню учреждений здравоохранения, осуществляющих трансплантацию тканей человека; — перечню учреждений здравоохранения, осуществляющих забор и заготовку тканей человека.

4. Неисполнение требований инструкций, утвержденных приказом Минздрава России от 25.07.03 г. № 325 «О развитии клеточных технологий в РФ».

5. Неисполнение требований приказа МЗ и СР РФ от 20.07.07 г. № 488 «Об утверждении административного регламента Федеральной службы

по надзору в сфере здравоохранения и социального развития по исполнению государственной функции по выдаче разрешений на применение новых медицинских технологий»:

5.1. Неинформирование пациента о применении новой медицинской клеточной технологии — впервые предлагаемые к использованию на территории РФ или усовершенствованные совокупности методов (приемов, способов) лечения, диагностики, профилактики, реабилитации, средств, с помощью которых данные методы осуществляются, а в некоторых случаях и способ получения средства, применяемого в данной технологии.

5.2. Нарушение требования: «Методы и средства, применяемые в новых медицинских технологиях, могут включать в себя использование лекарственных средств и изделий медицинского назначения при условии, что они зарегистрированы в установленном порядке в РФ и используются в строгом соответствии с утвержденными при регистрации инструкциями по медицинскому применению. Использование в новых медицинских технологиях зарегистрированных в РФ лекарственных средств и (или) изделий медицинского назначения с отклонениями от инструкций по медицинскому применению не допускается».

5.3. Неинформирование пациентов о том, что медицинские технологии, связанные с использованием клеточных технологий и генных манипуляций отнесены к медицинским технологиям с высокой степенью риска: «1.5... классификация в зависимости от степени потенциального риска применения в медицинских целях по трем классам: — класс 3 — медицинские технологии с высокой степенью риска, включающий в себя медицинские технологии, оказывающие прямое (хирургическое) воздействие на органы и ткани организма; пластические реконструктивные операции; медицинские технологии, связанные с использованием клеточных технологий и генных манипуляций, трансплантации органов и тканей».

6. Нарушение требований о безопасности клеточных технологий — наличие необоснованного риска медицинского вмешательства; выполнение в отсутствие показаний и не в соответствии с имеющимся заболеванием; выполнение без учета противопоказаний к вмешательству.

Признаки необоснованного риска использованию клеточных технологий:

- 1) цель может быть достигнута без риска;
- 2) риск развития ятрогенного осложнения больше, чем риск неблагоприятного исхода без применения данного метода;
- 3) наступление вредных последствий вмешательства неизбежно;
- 4) не использованы без положительного результата все менее опасные методы лечения;

5) врач не предвидит возможные осложнения применяемого метода и не предпринимает мер для их предотвращения, своевременного выявления и лечения;

6) нарушены требования инструкции по применению лекарственных средств и изделий медицинского назначения;

7) отсутствует согласие пациента на применение рискованных медицинских действий на основе клеточных технологий.

Цитофенотип клеточного препарата, использующегося для терапии поражений эндотелия роговицы

Суббот А.М.^{1,2}, *Антохин А.И.*², *Каралкин П.А.*³, *Павлюк А.С.*^{1,2},
Баранов П.Ю.^{1,2}

НИИ глазных болезней РАМН 119021, г.Москва, ул. Россолимо, д. 11А и Б; РГМУ им Н.И. Пирогова 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1; НИИ биомедицинской химии имени В.Н.Ореховича РАМН 119121, г.Москва, ул. Погодинская, д. 10

Актуальность. Для лечения наиболее тяжелых поражений эндотелия роговицы — буллезной кератопатии и эндотелиальных форм офтальмогерпеса в НИИ глазных болезней РАМН разработана и применяемая авторская методика клеточной терапии. Принцип данного метода заключается в получении из периферической крови пациента лейкоцитов без использования антикоагулянтов, токсичных для эндотелия роговицы, их стимуляции процессами свертывания крови и добавлением индуктора синтеза цитокинов, и последующем введении в переднюю камеру глаза. Несмотря на высокую клиническую эффективность, подтвержденную успешным применением методики у более чем 100 пациентов, экспериментальные исследования, направленные на изучение этой оригинальной преактивированной клеточной фракции, ограничивались лишь выборочными лабораторными тестами и аппроксимацией результатов, полученных на стандартной фракции мононуклеарных клеток.

Цель. Охарактеризовать состав клеток, выделенных оригинальным авторским способом.

Материалы и методы. Метод получения клеток — забор крови в стерильную пробирку содержащую раствор поли Адениловой — поли Уридиловой кислот (препарат Полудан), затем пробирка помещается в термостат

с температурой 37 градусов Цельсия на 4 часа. За это время в ней происходит свертывание крови и образование фибринового сгустка, сбор клеток над фибриновым сгустком проводится в стерильном боксе после центрифугирования. Подсчет ядросодержащих элементов проводили в камере Горяева после лизирования эритроцитов в 3 % растворе уксусной кислоты. Цитологический анализ препаратов проводили на мазках, окрашенных по Романовскому — Гимзе. Фенотипирование проводили на проточном цитофлюориметре BD FACS ARIA по следующим поверхностным маркерам — CD14,4,8,3,19,16,56,34. Определение популяции клеток с фенотипом CD14/34^{low} проводили с использованием усилителя флюоресценции FASER по протоколу производителя.

Результаты. Цитологически было показано, что в полученных клетках содержание моноклеарной фракции по сравнению с цельной кровью снижено в 1,5 раза и соответственно увеличено количество полиморфноядерных клеток. Методом проточной цитометрии было установлено, что в выделенных лимфоцитах присутствуют те же субпопуляции, что и в периферической крови, но наблюдается селективная потеря во фракции В-лимфоцитов. Вероятно, потеря В-лимфоцитов происходит за счет их «залипания» на нитях фибрина в процессе образования кровяного сгустка. Кроме того, показано, что в используемых клеточных препаратах содержится от 0,12 до 1,5 % клеток (от всех ядросодержащих) с поверхностной экспрессией CD14/34^{low}, для которых в литературе была описана трехлинейная дифференцировка (мультипотентность).

Заключение. Используемая методика позволяет выделить оригинальную преактивированную клеточную фракцию, которая может быть использована для терапии различных патологических состояний органа зрения и не только.

Взаимодействие клеток мезенхимального происхождения и аллогенных иммунокомпетентных клеток человека в экспериментах *in vitro*

Суздальцева Ю.Г.^{1,4}, Рубцов Ю.П.², Чеглаков И.Б.³, Воронов А.В.⁴

¹ *Российский кардиологический научно-производственный комплекс, г. Москва.*

² *Факультет фундаментальной медицины, МГУ, г. Москва.*

³ *Институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, г. Москва.*

⁴ *Российский государственный медицинский университет, г. Москва*

В настоящее время научным сообществом обсуждается возможность трансплантации мезенхимальных стволовых клеток человека (МСК) для лечения большого круга заболеваний. До сих пор основное внимание уделялось изучению способности МСК к дифференцировке *in vitro* и *in vivo* в различные типы клеток (костные, хрящевые, и жировые), их миграции в поврежденные ткани и регенеративные способности. Однако, терапевтический потенциал МСК неразрывно связан с влиянием иммунной системы, т. е. воздействием клеток иммунной системы на МСК при трансплантации, от которого напрямую зависит время жизни клеток донора в организме хозяина, способность к миграции и дифференцировке в клетки поврежденной ткани или органа. Изучение взаимодействия МСК с мононуклеарными клетками периферической крови (МПК) *in vitro* позволяет прогнозировать результат взаимодействия иммунокомпетентных клеток реципиента с клетками, предназначенными для трансплантации, *in vivo*.

Целью исследования являлось изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК КМ), фибробластоподобных клеток, изолированных из пуповины новорожденного (ФП), и фибробластов кожи (ФК) взрослого донора с МПК *in vitro*.

Полученные культуры клеток были исследованы методом проточной цитофлуориметрии на экспрессию маркеров прогениторных и стволовых, а также методами иммуногистохимии на способность к дифференцировке в адипоциты, остеобласты и хондроциты. Все клетки исследуемых культур не экспрессировали маркеры гемопоэтических клеток CD34, CD45, HLA-DR и экспрессировали маркеры мезенхимальных клеток CD44, CD73, CD90, CD105. Было установлено также, что клетки полученных культур различаются по уровню экспрессии белков главного комплекса гистосовместимости I класса HLA-ABC. Самый высокий уровень экспрессии HLA-

ABC наблюдали в культуре ФК. Средний уровень экспрессии HLA-ABC наблюдали в культуре МСК КМ. Культура ФП была неоднородна. В ней встречались мелкие клетки со средним уровнем экспрессии HLA-ABC, а также крупные клетки, экспрессирующие эти белки на фоновом уровне.

Сравнительный анализ способности к дифференцировке показал, что МСК КМ обладают способностью дифференцироваться в жировую, хрящевую и костную ткань и являются мультипотентными стромальными клетками; ФП обладают способностью дифференцироваться в адипоциты и хондроциты, и только незначительная часть ФП способна дифференцироваться в остеобласты (таким образом, мультипотентными стромальными клетками может считаться только часть клеток культуры ФП); ФК могут дифференцироваться только в жировую ткань.

Изучение клеточно-опосредованной цитотоксичности при взаимодействии клеток полученных культур с МПК проводили с использованием набора Cytotox 96 (Promega), предназначенного для оценки функциональной активности NK/LAC-клеток. Клетками-мишенями в наших экспериментах служили ФК, ФП и МСК КМ, а также культуры В-лимфомы РЗНР1 в качестве положительного контроля. Клетками-эффекторами служили аллогенные МПК. В эксперименте использовали соотношения МПК к клеткам-мишеням от 1:2 до 1:250. При максимальном соотношении МПК и клеток-мишеней 250:1 количество поврежденных клеток составило для РЗНР1 – 60 %. В условиях эксперимента МПК оказывали цитотоксическое действие на клетки культуры РЗНР1 при соотношении клеток превышающем 2:1. Цитотоксическое действие МПК на культуры клеток ФК, ФП и МСК костного мозга в условиях эксперимента было незначительное (не превышало 10 %) и не зависело от соотношения клеток-эффекторов и клеток-мишеней.

Таким образом, в проведенных экспериментах клетки мезенхимального ряда, независимо от происхождения, способности к дифференцировке и уровня экспрессии HLA-ABC, не лизируются в смешанных культурах с аллогенными МПК.

Предифференцированные мезенхимальные фибробластоподобные стволовые клетки из жировой ткани человека для тканеинженерной конструкции хрящевой ткани

Сургученко В.А.², Пономарева А.С.¹, Можейко Н.П.², Ильинский И.М.², Севастьянов В.И.²

¹Московский физико-технический институт (Государственный университет), 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер., д. 9

²ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздравсоцразвития», 123182 г. Москва, ул. Щукинская, д. 1

Использование мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в сочетании с биоматриком является наиболее перспективным направлением исследований для лечения суставных повреждений и дегенеративных заболеваний хрящевой ткани.

В лаборатории биоматериалов и систем доставки ФГУ «ФНЦТ и ИО им. ак. В.И. Шумакова Минздравсоцразвития» показана эффективность получения предифференцированных МСК из подкожно-жировой клетчатки человека в хондрогенном направлении. На 2й — 3й день после индукции хондрогенной дифференцировки МСК из жировой ткани человека образовывали трехмерную структуру в виде непрозрачных микросфер диаметром ~ 1 мм. Культура МСК на 14 сутки хондрогенной дифференцировки давала окрашивание альциановым синим на гликозаминогликаны, которые являются одним из основных компонентов внеклеточного матрикса хрящевой ткани. Анализ гистологической картины срезов показал наличие внутри микросфер структур, характерных для нормальной хрящевой ткани. Периферия каждой микросферы состоит из 1-2 слоев хондробластов. Под слоем хондробластов в гистологических препаратах микросфер присутствуют молодые и зрелые хондроциты. В препаратах также отсутствуют признаки трансформации хондроцитов в фибробласты. Были получены предварительные положительные результаты по созданию тканеинженерной конструкции хрящевой ткани на основе гетерогенного коллагенсодержащего имплантируемого матрикса Сферо®ГЕЛЬ и предифференцированных МСК из жировой ткани человека.

Использование стволовых клеток костного мозга для направленного транспорта лекарственных веществ

Темнов А.А.¹, Лысков Н.Б.¹, Склифас А.Н.², Кукушкин Н.И.², Белый Ю.А.³

¹НИИ Скорой помощи им.Н.В.Склифосовского, Москва; ²Учреждение РАН ИБК РАН, г.Пушино; ³Калужский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова Росмедтехнологии»

Целью работы: изучить возможность направленного транспорта лекарственных препаратов, сорбированных на поверхности наночастиц (НЧ) и введенных внутрь мезенхимальных стволовых клеток, у животных с опухолью молочной железы.

Материалы и методы: В работе использовались НЧ перфторуглеродной эмульсии (ПФУ). В качестве лекарственных веществ (ЛВ), которые сорбировали на поверхности НЧ, использовали: Радахлорин и доксорубицин. В качестве донора стволовых клеток (СК) был использован костный мозг мышей линии C57black10 GFP. После 5 дней культивирования к прикрепившемуся СК костного мозга добавляли НЧ эмульсии с сорбированными на них ЛВ и инкубировали в течение 30 минут при 37⁰С. Клетки с НЧ эмульсии, содержащими ЛВ, трансплантировали реципиенту — мышам линии C57black с опухолью молочной железы. Через 5 дней после трансплантации у животных забивали, а ткани печени, костного мозга и опухоли молочной железы забирали для гистологии и определения содержания частиц ПФУ методом хромато-масс-спектрометрии. **Результаты:** Показано, что СК донора, содержащие НЧ ПФУ эмульсий с ЛВ, после трансплантации в организм реципиента детектируются в опухолевой ткани, костном мозге, печени и селезенке. ЛВ, содержащиеся в донорских СК и выделенные из организма реципиента через 5-7 дней после трансплантации, сохраняют свои фармакологические свойства. По данным хромато-масс-спектрометрии СК донора, содержащие НЧ с ЛВ, в организме реципиента с экспериментальной опухолью молочной железы, преимущественно накапливаются в тканях опухоли (до 30% от введенных клеток).

Генетическая сенсбилизация как новый подход в подавления туморогенности плюрипотентных стволовых клеток

Томилин А.¹, Лисковых М.¹, Толкунова Е.¹, Чуйкин И.², Мосиенко В.², Шеллер М.², Бадер М.², Аленина Н.²,

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург*

² *Центр биомедицины им. Макса Дельбрюка, Берлин*

Пока еще нерешенной проблемой, стоящей на пути к использованию эмбриональных стволовых (ЭС) и недавно открытых индуцированных плюрипотентных стволовых (иПС) клеток в клинической практике, является их туморогенность. Существующие же способы направленной дифференцировки ЭС и иПС клеток *in vitro* позволяют получить весьма гетерогенные популяции, в которых практически всегда присутствуют остаточные недифференцированные ЭС и иПС клетки, способные дать начало тератомам. В докладе описан подход, основанный на методе генетической сенсбилизации и включающий в себя генетическую модификацию ЭС и иПС клеток бицистронной ДНК кассетой под контролем энхансера гена Oct4 (2A2Btk-TKiresPuго). Использование такой кассеты позволяет сначала позитивно отбирать трансгенные ЭС и иПС клетки (за счет резистентности к пурамицину), а затем, после их дифференцировки в культуре или даже непосредственно в организме реципиента, селективно элиминировать (в присутствии ганцикловира) резидуальные количества этих туморогенных клеток за счет экспрессии в них гена-самоубийцы, тимидин киназы (ТК), не затрагивая при этом остальные клетки. Возможность элиминации ЭС и иПС клеток *in vivo* может являться особенно востребованной в случаях, когда дифференцировка *in vitro* неэффективна, что проиллюстрировано нами на примере замещения кровотока у мышей. В докладе будут также обсуждаться способы улучшения предлагаемого подхода, основанные на использовании неинтегрирующих систем. В более широком смысле, будет обсуждаться возможность генной терапии за счет тканезамещения на основе ЭС и иПС клеток, позволяющая приблизиться к лечению в т.ч. рецессивных наследственных заболеваний человека без тератомных осложнений, а также без риска мутагенеза, часто вызываемого интеграцией в геном генотерапевтической или сенсбилизующей ДНК.

Пространственно-временная динамика выделения H₂O₂ в клетках-предшественниках

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

¹ *Факультет Фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, Москва, 119192, Ломоносовский пр., д.31, корп.5*

² *Институт Биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова*

Стволовые и прогениторные клетки (клетки-предшественники) - это клетки, обладающие специфической способностью к самообновлению и дифференцировке. Культуры клеток-предшественников гетерогенны, поэтому к ним неприменимы стандартные биохимические методы исследования, а сигнальные каскады, протекающие в них, в настоящее время мало изучены. Мы использовали методы анализа единичных клеток для изучения роли перекиси водорода (H₂O₂) в проведении сигналов от рецепторов факторов роста.

Клетки продуцируют H₂O₂ как часть физиологического ответа на факторы роста. Например, стимуляция фибробластов тромбоцитарным фактором роста (PDGF) приводит к выделению H₂O₂ в районе плазматической мембраны (Mishina N et al., 2010). H₂O₂ в данном случае выступает в роли вторичного посредника передачи внутриклеточного сигнала. Однако до сих пор неизвестно, участвует ли H₂O₂ в передаче внутриклеточного сигнала рецепторов факторов роста при стимуляции миграции клеток-предшественников.

Мы разработали метод измерения динамики образования H₂O₂ и определения её локализации внутри клетки при помощи флуоресцентного биосенсора HyPer, чувствительного к H₂O₂. При помощи набора вариантов биосенсора с различной внутриклеточной локализацией мы измеряли динамику образования H₂O₂ в нескольких компартментах клетки hASC. Согласно нашим предварительным данным, H₂O₂ образуется в hASC локально, в районе плазматической мембраны.

Таким образом, мы разработали методику, которая позволяет изучать сигнальные каскады в индивидуальных клетках гетерогенных культур hASC.

Mishina N*, Tyurin-Kuzmin P*, Markvicheva K, Vorotnikov A, Tkachuk V, Laketa V, Schultz C, Lukyanov S, Belousov V. (2010) Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally? *Antioxid Redox Signal*. Aug 8. [Epub ahead of print]

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток лимбальной зоны донорского глаза человека

Тонаева Х.Д., Борзенко С.А., *Онищенко Н.А., Комах Ю.А., Ковшун Е.В., *Крашенинников М.Е.

*ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Федорова», Москва; *ФГУ «ФНЦ трансплантологии и ИО им. акад. В.И. Шумакова», Москва*

АКТУАЛЬНОСТЬ. В связи с ростом числа повторных пересадок, малой эффективностью и высоким процентом развития побочных эффектов медикаментозных средств посттрансплантационной иммуносупрессии, в настоящее время пристальное внимание стало уделяться свойствам мезенхимальных/прогениторных стволовых клеток (МПСК), способных формировать иммунную толерантность при их сотрансплантации с донорским органом. Это положение актуально и для офтальмологии, так как в связи с развитием «болезни трансплантата роговицы» у пациентов, входящих в группу «кератопластики высокого риска», доля повторных пересадок достаточно высока и составляет 25–37 %. Также известно, что в лимбальной зоне глаза в зонах палисад Фогта локализуются клетки, обладающие фенотипом мезенхимальных прогениторных/стволовых клеток (МПСК), которые могут быть объектом выбора для сотрансплантации с донорской роговицей в качестве клеточных индукторов локальной иммуносупрессии.

ЦЕЛЬ. Разработка технологии выделения и культивирования аллогенных лимбальных мезенхимальных стволовых клеток глаза человека для сотрансплантации с донорской роговицей при кератопластике высокого риска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Из глаз трупов-доноров роговиц с помощью микрохирургической техники из перилимбальной зоны выделялись тканевые лоскуты с палисадами Фогта. В процессе выделения и культивирования МПСК был разработан оптимальный протокол, согласно которому тканевые лоскуты подвергались обработке 0,03 % коллагеназой II типа в течение 4 ч при +4°C, затем в течение 15 мин — диспазой II при +37°C. Для культивирования использовался стандартный состав питательных сред DMEM/F-12, содержащий ряд ростовых факторов. В работе применялись гистологические, иммуноцитохимические, морфометрические методы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В процессе органного культивирования лимбальных лоскутов в течение 6 недель наблюдалось митотическое деление МПСК в межфибриллярных пространствах с сохранением стволовости молодых клеток, определяемой цитологическими и иммуноцитохими-

ческими методами. Причем прирост МПСК, определяемый методом темнопольной статистической морфометрии, был значительным и оптимальным для сотрансплантации прокультивированных лоскутов реципиентам при кератопластике высокого риска. Однако для суждения об их супрессивной функциональной активности требуется дальнейшее проведение исследований цитокинового статуса *in vitro*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Определены оптимальный режим и номинальный срок (6 недель) культивирования МПСК для сотрансплантации с донорской роговицей человека при кератопластике высокого риска.

Анализ результатов трансплантации аутологичных гемопоэтических стволовых клеток у 180 больных рассеянным склерозом

Федоренко Д.А., Ионова Т.И. , Карташов А.В. , Кузнецов А.Н. , Новик А.А.

*Национальный медико-хирургический центр им. Н.И.Пирогова,
105203 Москва, ул. Нижняя Первомайская, д. 70*

Введение. Традиционные методы лечения рассеянного склероза (РС) не позволяют достичь выраженного и устойчивого терапевтического эффекта. Новым перспективным методом лечения РС является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Цель исследования — изучить результаты ТГСК ± консолидация у больных РС в различные сроки после трансплантации.

Материалы и методы: В исследование включено 180 больных РС: 66 пациентов с вторично-прогрессирующим, 31 с первично-прогрессирующим, 85 с рецидивирующе-ремиттирующим, 5 с прогрессирующе-рецидивирующим течением; 78 мужчин, 109 женщин; средний возраст — 32,0 года. Стимуляцию ГСК проводили гранулоцитарным колониестимулирующим фактором в дозе 10 мкг/кг в течение 4-х дней, кондиционирование по протоколу BEAM или VM. 130 больных не получали консолидацию после ТГСК; 57 — получали консолидацию Митоксантроном. Медиана Индекса инвалидизации до ТГСК составила 4.0 по шкале EDSS (колебания от 1.5 до 8.5), длительности наблюдения за больными после ТГСК 26 месяцев (от 1 до 135 месяцев). Клинические параметры оценивали до ТГСК, при выписке, через 3, 6, 9 и 12 месяцев после ТГСК, затем каждые 6 месяцев в течение первых 4 лет и далее ежегодно.

Результаты. У всех больных после ТГСК получено либо клиническое улучшение, либо стабилизация заболевания. В отдаленном периоде после ТГСК при среднем сроке наблюдения 34 месяца в группе ТГСК без консолидации улучшение достигнуто у 40 % и стабилизация у 45 % больных, т. е. клинический ответ зарегистрирован у 85 % пациентов. В группе ТГСК с консолидацией при медиане наблюдения 23 месяца клинический ответ получен у 100 % больных: улучшение у 67 % и стабилизация у 33 % пациентов.

Заключение: Результаты исследования свидетельствуют о высокой клинической эффективности ТГСК при РС. Перспективной представляется оригинальная стратегия ТГСК с консолидацией Митоксантроном, позволяющая получить клинический ответ у 100 % пациентов РС. Необходимы более длительные сроки наблюдения за пациентами РС после ТГСК для окончательных выводов о роли консолидирующей терапии.

Получение инсулин-продуцирующих клеток из различных популяций мультипотентных стромальных клеток (МСК) жировой ткани и пупочного канатика человека

Федюнина И. А.^{1,2}, Омельченко Д. О.¹, Ржанинова А. А.^{1,2},
Гольдштейн Д. В.^{1,2}

¹ *ГУ Медико-генетический научный центр РАМН, Москва*

² *ЗАО «РеМетЭкс», Москва*

Одним из наиболее перспективных способов лечения сахарного диабета I типа (СД1) является получение инсулин-продуцирующих клеток из альтернативных источников. Из липоаспиратов жировой ткани, а также пупочных канатиков человека были изолированы и пассированы МСК по стандартной методике (CD146-), которые характеризовались фенотипом CD29+, CD44+, CD49a+, CD73+, CD90+, CD166+, CD45-, CD146-, CD31-. А также был разработан протокол получения популяций МСК (CD146+) с тем же фенотипом, но, имеющих маркер CD146+. Клеточные культуры МСК CD146+ и CD146- трансфицировали рAd5-Pdx1. Сорбцию аденовируса проводили 2, 6, 24 или 30 часов. Далее клетки инкубировали в течение 5–7 дней в бессывороточной среде CMRL 1066, содержащей глюкагоноподобный пептид и ретиноевую кислоту. Анализ транскрипции генов панкреатической дифференцировки проводили с помощью ПЦР в реальном

времени. Показали, что наилучшее время адсорбции аденовируса, которое определяли по уровню транскрипции гена Pdx1, составило 6ч для МСК CD146- и 24ч для МСК CD146+. Трансфекция Pdx1 в клеточных культурах обоих типов приводила к активации транскрипции генов, участвующих в пути дифференцировки стволовых клеток в β -клетки: NeuroD, NGN3 и MafA. Транскрипцию гена инсулина в трансфицированных культурах МСК CD146- не обнаружили. В аналогичных условиях трансфекция МСК CD146+ приводила к активации транскрипции гена инсулина на высоком уровне. Тест на толерантность к глюкозе показал, что клетки увеличивали экспрессию инсулина в ответ на увеличение концентрации глюкозы в среде. Впервые продемонстрирована эффективная направленная дифференцировка CD146+ популяций МСК из жировой ткани и пупочного канатика в инсулин-продуцирующие клетки путем введения ключевого гена панкреатической дифференцировки Pdx1, что позволяет предположить возможность их перспективного использования в клеточной терапии СД1.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 09–04–00724-а) и Федерального агентства по науке и инновациям (грант № 02.740.11.0704)

irina_spirova@list.ru 115478, г. Москва, ул. Москворечье, д. 1, тел. 8 (499) 6128604

Трансплантация стволовых клеток при травме сетчатки

Е.В. Ченцова, И.Т. Купрашвили, М.В. Зуева, И.В. Цапенко,
И.Н. Сабурова, А.В. Ракова.

*МНИИ ГБ им. Гельмгольца, г. Москва, ул. Садовая-Черногрязская,
14/19*

Введение.

Одним из наиболее тяжелых осложнений травматических повреждений глаза является поражение сетчатки. В дальнейшем это приводит к нарушению микроциркуляции, обменных и восстановительных процессов, структурной организации сетчатки и, как следствие, необратимой потере зрения. Применение клеточных технологий является актуальным направлением для лечения инкурабельных заболеваний сетчатки.

Цель.

Изучить влияние трансплантации нейрональных стволовых/прогени-

торных клеток (НСПК) выделенных из обонятельной области слизистой оболочки носа взрослого человека, на процессы репарации, регенерации и сохранность функциональной активности сетчатки после ее повреждения в эксперименте.

Материалы и методы.

Источником первичной культуры НПСК являлась слизистая обонятельной области носа взрослого человека, которую брали во время эндоскопической ЛОР операции.

Проводилась лазерная коагуляция сетчатки обоих глаз с помощью аргоновой лазерной установки Visulas Argon II (Karl Zeiss, Германия). Работа проводилась на 86 кроликах (172 глаза) породы Шиншилла. Состояние переднезаднего отрезка глаз оценивали с помощью биомикроскопии, офтальмоскопии и фоторегистрации.

Результаты.

В ранние сроки после лазерного воздействия трансплантация НСПК способствовала сохранению ретикулярной функции и меньшей выраженности изменений на глазном дне. В более поздние сроки (3-4 недели), когда в обоих глазах происходило частичное восстановление кровообращения сетчатки, введение НСПК способствовало лучшей динамике восстановления электрогенеза сетчатки. В ранние сроки, отмеченные положительные эффекты НСПК на функцию сетчатки, выявлялись не у всех животных и не в одинаковой степени. В 40-45% случаев по разным группам эксперимента не выявлялось никаких различий в опыте и контроле. Однако для периода наблюдения 1 сутки и 1 месяц различия достоверны ($p < 0,05$).

Гистоморфометрические исследования свидетельствуют, что трансплантация СК не вызывает каких-либо воспалительных и аллергических реакций. Введенные интравитреально клетки пролиферируют в стекловидном теле, сохраняют жизнеспособность до 30 дней. Трансплантация супрахориоидально НСПК стимулирует репаративные процессы в сетчатке и защищает ее от развития вторичных дистрофических изменений при лазерном повреждении, что выражается в виде меньшей площади повреждения в опытных глазах при одинаковых условиях лазеркоагуляции.

Заключение:

Учитывая доказанное нейропротекторное действие стволовых клеток при трансплантации на моделях лазеркоагуляции и лазерной ишемии сетчатки, можно рекомендовать их применение для клинической апробации при заболеваниях сетчатки различного генеза, особенно при последствиях посттравматической патологии дистрофического характера.

Особенности коллагенового состава волокнистой матрицы для клонирования окончательной почки человека

Шаповалова Е. Ю., Бойко Т. А.

Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского. 95006, Украина, АР Крым, г. Симферополь, б. Ленина 5/7, КГМУ, кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии.

Становление коллагенового состава волокнистого каркаса метанефроса изучено с помощью метода иммуногистохимии у 119 зародышей человека в возрасте от 21 суток до 12 недель внутриутробного развития, которые были фиксированы формалином и залиты в парафин. Первичными антителами были моноклональные антитела к коллагену I типа (Isotype Ig G1, Chemicon International), коллагену II типа (клон COLL-II, Isotype Ms Ig G1-kappa, Chemicon International), коллагену III типа (Isotype Ig G1, Chemicon International) и коллагену IV типа (клон CIV 22, Dako Cytomation). В качестве растворителя антител использовали раствор Antibody Diluent (Dako Cytomation).

В строме окончательной почки первыми появляются коллагеновые волокна третьего типа у зародышей в возрасте 49–50 суток (20–21 мм длины) в капсуле, в волокнистой строме вокруг почечных лоханок, больших чашечек и S-образных зачатков нефронов первой генерации. В дальнейшем по мере развития коркового вещества и дифференцировке метанефронов последующих генераций в эмбриональной соединительной ткани вокруг них первыми синтезируются коллагеновые волокна третьего типа. Коллагеновые волокна первого типа выявляются позднее и повторяют динамику и гистотопографию коллагеновых волокон третьего типа, но их значительно меньше. Коллагеновые волокна второго типа присутствуют в строме окончательной почки с 11-й недели (зародыши 46–56 мм длины) развития и заметно не увеличиваются количественно и в толщину до конца изученного периода эмбриогенеза. У зародышей в возрасте 10 недель (33–45 мм т.-к. длины) базальная мембрана эндотелия кровеносных сосудов стромы и клубочков и базальная мембрана канальцев и наружного листка капсулы почечных телец метанефронов обогащается коллагеновыми волокнами четвертого типа. Коллагеновые волокна четвертого типа, по мнению многих авторов, является обязательным компонентом фильтрационного барьера окончательной почки [Kitsiou P. V., 2003; Pedchenko V. K., 2005 и др.].

Таким образом, при создании коллагеновой матрицы для миграции эпителиальных клеток при формировании новых нефротических единиц необходимо преимущественно использовать коллагеновые волокна третьего типа и в небольшом количестве коллагеновые волокна первого типа.

Предварительные результаты конструирования биокератопротезного комплекса с использованием аутофибробластов кожи реципиента

Шипунова А.В., Борзенко С.А., **Васильев А.В., **Дашинимаев Э.Б., Комах Ю.А., Ковшун Е.В., Волкова О.С.

ФГУ «МНТК «Микрохирургии глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмедтехнологий», Москва, Бескудниковский бульвар д.59а, тел.: 906-50-01, E-mail: iris@mntk.ru

***НИИ Биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва*

АКТУАЛЬНОСТЬ. В настоящее время кератопротезирование остается единственным эффективным методом восстановления зрения пациентам с тяжелыми осложненными бельмами. Однако высокий риск отторжения кератопротезов (до 75% и более) в связи с кератомалацией иммуновоспалительного генеза обуславливает особенную актуальность данной проблемы. Распространенным подходом в инжиниринге тканей является создание биопротезов, содержащих аллогенные фибробласты в комбинации с полимерными матрицами, интегрированными в организм реципиента. По нашему мнению, использование аутологичных постнатальных фибробластов кожи для конструирования биокератопротезного комплекса является перспективным направлением с точки зрения профилактики развития посттрансплантационных реакций.

ЦЕЛЬ. Разработка технологии изготовления конструкции биокератопротезного комплекса на основе аллогенной донорской роговицы и прокультивированных аутофибробластов кожи реципиента для лечения осложненных бельм.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В эксперименте *in vitro* использовались кадаверные роговицы человека, неостребованные для трансплантации, предварительно подвергнутые процедуре кросслинкинга для увеличения прочностных свойств коллагеновых волокон. В качестве клеточных элементов биокератопротезного комплекса применялись выделенные и прокультивированные на коллагеновых микроносителях мортальные пост-

натальные аутофибробласты кожи, трансфецированные геном зеленого флуоресцентного белка EGFP, для возможности витальной визуализации клеточных элементов в трупной роговице.

Исследования проводились с использованием культуральных, морфологических и иммуноцитохимических методов исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Полученная конструкция биокератопротезного комплекса состоит из фотохимически стабилизированной роговицы, в интрастромальный карман которой введены титановая опорная пластина кератопротеза модели Федорова-Зуева и аутофибробласты, прокультивированные на коллагеновых микроносителях.

Фотохимически модифицированная донорская аллогенная роговица, имея прочный стромальный каркас с параллельными коллагеновыми пластинами и межпластинчатыми пространствами, является естественной биологической матрицей для аутофибробластов, способствуя их оптимальной инвазии.

Выраженная адгезия аутофибробластов к опорной титановой пластине кератопротеза подтверждена формированием на ее поверхности клеточного монослоя.

Пролиферация и миграция фибробластов в интрастромальном кармане способствовала образованию фибриллярного синцития и интеграции коллагена микроносителей в строму роговицы.

ВЫВОДЫ. Результаты конструирования биокератопротезного комплекса в эксперименте *in vitro* позволяют считать предложенную конструкцию пригодной для проведения дальнейших экспериментов *in vivo*.

Возможности оптимизации репаративного остеогенеза при трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) на деминерализованном костном аллотрансплантате

Щепкина Е.А.^{1,3}, Кругляков П.В.², Соломин Л.Н.¹, Зарицкий А.Ю.³, Тихилов Р.М.¹, Полынцев Д.Г.²

ФГУ «РНИИТО им. Р.Р.Вредена» Минздравсоцразвития России, СПб, ул. акад. Байкова, д.8; ООО «Транс-Технологии», СПб, пос.Песочный, ул.Ленинградская, д.70, лит.В; ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова» Минздравсоцразвития России, СПб, ул. Л.Толстого, д.6-8

Аутологичные ММСК выделяли из костного мозга пациента, культивировали в монослое, охарактеризовывали по фенотипу CD 34-; CD 45-; CD 44+; CD 90+; CD 105+; CD 106+. При подготовке биотрансплантата (патент РФ № 2309756) ММСК заселяли на деминерализованные костные аллотрансплантаты (ДКТ) с плотностью 7–10 млн. на 1 см³, которые использовали для костной пластики после резекции ложного сустава и открытой адаптации фрагментов, применяли чрескостный остеосинтез. По предложенному методу оперировано 15 пациентов в возрасте от 25 до 59 лет с ложными суставами бедренной и большеберцовой костей. Сравнение результатов проведено в группах больных по 10 пациентов (в контрольной использовании ДКТ без заселения МСК). Сроки демонтажа аппарата внешней фиксации в основной группе соответствовали срокам сращения переломов ($18,9 \pm 4,7$ недель ($p < 5\%$)) и были в 1,7 раза меньше, чем в контрольной ($32,85 \pm 2,03$ недель ($p < 2,3\%$)). По данным рентгенографии и КТ в основной группе сращение происходило преимущественно через трансплантат, в котором отмечено формирование очагов остеогенеза с последующим их слиянием; отсутствовала выраженная периостальная мозоль; в сроки от 6 месяцев до 4 лет формировался костномозговой канал, в контрольной группе — сращение преимущественно за счет периостальной мозоли. При обследовании на сроке 3–5 лет у всех пациентов результаты оценены как хорошие и удовлетворительные. Биотрансплантат использован с положительным результатом для замещения нециркулярных дефектов бедренной, большеберцовой, плечевой, пяточной костей у 9 пациентов.

Оптимизация органо-типической перестройки дистракционного регенерата при трансплантации аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК)

Щепкина Е.А.^{1,3}, Кругляков П.В.², Соломин Л.Н.¹, Зарицкий А.Ю.³, Тихилов Р.М.¹, Полынцев Д.Г.²

ФГУ «РНИИТО им. Р.Р.Вредена» Минздравсоцразвития России, СПб, ул. акад. Байкова, д.8; ООО «Транс-Технологии», СПб, пос.Песочный, ул.Ленинградская, д.70, лит.В; ГОУ ВПО «СПбГМУ им. акад. И.П.Павлова» Минздравсоцразвития России, СПб, ул. Л.Толстого, д.6-8

Клиническое исследование проведено в группе пациентов в возрасте от 18 до 55 лет, которым производилось удлинение или замещение дефекта большеберцовой или бедренной кости путем формирования дистракционного регенерата с темпом 1 мм в день за 4 приема. Аутологичные ММСК выделяли из костного мозга пациента, культивировали в монослое, охарактеризовывали по фенотипу CD 34-; CD 45-; CD 44+; CD 90+; CD 105+; CD 106+. Введение суспензии ММСК в растворе 10% аутосыворотки в область регенерата производили инъекционно из 3-4 проколов под контролем рентгеноскопии в конце фазы дистракции из расчета 7-10 млн. на 1 см³. Демонтаж аппарата внешней фиксации производили после оценки рентгенологических данных и проведения клинической пробы. Проведена сравнительная оценка нормотрофических дистракционных регенератов после введения ММСК у 10 пациентов с аналогичной контрольной группой, где введение ММСК не производилось. Индекс фиксации составил $24,0 \pm 2,93$ дней/см (в контрольной группе - $37,125 \pm 5,005$ дней/см), доверительный коэффициент для разницы средних величин (t) составил 2,26, а показатель вероятности $p = 0,0415$. По данным рентгенографии и КТ отмечена более равномерная оссификация области регенерата, раньше формировался кортикальный слой кости. При хороших и удовлетворительных результатах лечения у всех больных на сроке 3-5 лет в регенератах после введения ММСК структура костной ткани более зрелая, что позволяет сделать вывод о стимулирующем воздействии ММСК на дистракционный остеогенез.

