

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

**ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**«StemCellBio-2016:
фундаментальная наука
как основа клеточных технологий»**

9 -11 ноября 2016 г.
г. Санкт-Петербург

2016 г.

СОЗДАНИЕ БАНКА КУЛЬТУР МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

Айзенштадт А.А.^{1,2}, Багаева В.В.¹, Александрова Л.В.¹, Золина Т.Л.¹, Котова А.В.¹, Супильникова О.В.^{1,2}, Старунова З.И.^x Чернова С.А.¹ Смолянинов А.Б., Адылов Ш.Ф.¹

1. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия.
2. НИЛ Клеточных технологий СЗГМУ им.Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.
aizendt@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) рассматриваются в качестве основы при создании биомедицинских клеточных продуктов для терапии различных заболеваний. Одним из актуальных вопросов является определение оптимального тканевого источника МСК, среди которых наиболее изученными являются костный мозг и жировая ткань, забор которых возможен только в ходе хирургических вмешательств. При этом МСК также могут быть выделены из различных регионов пупочного канатика (ПК), что не требует проведения инвазивных процедур для получения биоматериала.

Нами был создан банк культур МСК из периваскулярного пространства пупочного канатика человека (МСК ПК), насчитывающий сегодня более 800 паспортизованных культур. Для этого был разработан быстрый и воспроизводимый метод выделения МСК, снижающий общее время обработки ткани до 2 часов. Показано, что в ПК МСК содержатся в количестве, сопоставимом с получаемым при выделении МСК из 50-70 мл костного мозга, либо из 3-5 мл жировой ткани. Получение жизнеспособных и пролиферирующих МСК ПК возможно в течение 24ч после родов, но их количество снижается при транспортировке образца более 12 ч. В тоже время количество выделяемых МСК не зависит от возраста роженицы и срока гестации (37-41 нед).

Для характеристики культур МСК, предназначенных для криогенного хранения, была разработана система контроля качества, включающая в себя иммунофенотипирование (CD90+, CD105+, CD73+, CD44+, CD34-, CD45-, CD14-, CD117+, CD13+, CD10+), анализ пролиферативной активности, анализ на наличие бактериальной и грибковой контаминации, а также анализ дифференцировочного потенциала клеток.

При сравнении иммуномодулирующих свойств МСК ПК с МСК жировой ткани и костного мозга человека было показано, что функциональная активность МСК ПК относительно лимфоидных клеток сходна с МСК

жировой ткани и в части экспериментальных систем превышает таковую МСК костного мозга.

Таким образом, была создана коллекция первичных культур МСК ПК, морфо-функциональные характеристики которых позволяют рассматривать их в качестве перспективного источника для клинического применения.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ

Александрова О.И.¹, Хорольская Ю.И.¹, Дубовиков А.С.², Безушко А.В.², Чурашов С.В.², Черныш В.Ф.², Околов И.Н.³, Блинова М.И.¹

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
2. Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.
3. Санкт-Петербургский филиал ФГБУ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия.
elga.aleks@gmail.com

В настоящее время для целого ряда офтальмологических патологий не существует оптимальных патогенетически обусловленных методов лечения, что приводит к низкой эффективности терапии и росту инвалидизации пациентов. Применение клеточных технологий (КТ) в офтальмологии позволяет осуществить прорыв в этой области. Спектр применения разработок КТ широк - от лечения заболеваний (регенеративная терапия, тканевая инженерия, адресная доставка лекарственных препаратов, коррекции иммунных реакций) до их диагностики и профилактики (клеточные модельные тест-системы). Ткани глаза после повреждений могут восстанавливаться только в ограниченном объеме. Поэтому проблема реконструкции тканей остается актуальной в офтальмотравматологии. Наиболее перспективным методом, позволяющим влиять на ход репарации роговицы, рассматривают трансплантацию культивируемых стволовых клеток. В научном мире идет активный поиск источников стволовых клеток и материалов для создания клеточно-тканевых конструкций искусственной роговицы. В Институте цитологии РАН (ИНЦ РАН) проводятся исследования по созданию скаффолдов на основе коллагена и амниона для культивирования клеток и их последующего применения в офтальмохирургии. Не менее важной задачей клинической офтальмологии является сохранение структуры и физиологической функции роговицы при лекарственной терапии. Разработка модельных тест-систем на основе культивируемых клеток различных тканей глаза для изучения действия офтальмологических препаратов на жизнеспособность клеток в условиях *in vitro* может решить проблему устранения нежелательных реакций, возникающих при лекарственной терапии, что будет способствовать сохранению и поддержанию регенераторного потенциала клеток роговицы. В ИНЦ РАН успешно проведена серия исследований офтальмологических препаратов различных фармакологических групп с использованием разрабатываемых клеточных тест-систем.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-50-00068

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ ИСКУССТВЕННОГО КАРКАСА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ (IN VITRO)

Архипова С.С.¹, Журавлева М.Н.², Гилазиева З.Е.¹, Китаева К.В.¹, Салафутдинов И.И.², Шепелев А.Д.³, Тенчурин Т. Х.³, Чвалун С.Н.³, Маккиарини П.¹

1. OpenLab «Биоинженерии и регенеративной медицины (BioReM)», Казанский федеральный университет, Казань, Россия.
2. OpenLab «Генных и клеточных технологий», Казанский федеральный университет, Казань, Россия.
3. Курчатовский институт, Москва, Россия.
svetlanaarkhipva @yandex.ru

Развитие трансплантационной медицины и тканевой инженерии требует активного внедрения новых материалов, способных выполнять функцию каркасов при создании искусственных органов, в частности, пищевода. Основной проблемой использования искусственных материалов в трансплантологии является их биосовместимость с тканями и клетками организма-реципиента. Одним из перспективных материалов для использования в качестве каркаса для искусственно выращенного пищевода является полиамид-6, созданный с применением технологии электро-спиннинга. Однако имеющиеся в литературе данные по цитотоксичности и биосовместимости этого материала недостаточны для применения в тканевой инженерии. Таким образом, целью нашего исследования являлась оценка биологической совместимости каркасов из полиамида-6 со стволовыми, а также дифференцированными клетками.

В ходе работы исследовали диаметр волокон и размер пор полиамида-6 с использованием сканирующей электронной микроскопии. Оценку биосовместимости проводили с использованием 3 видов клеток - мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), выделенных из костного мозга и жировой ткани человека, а также эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES). Клетки выделяли согласно стандартным протоколам у здоровых добровольцев с их информированного согласия в соответствии с нормами, принятыми этическим комитетом КФУ. Клетки культивировали на каркасе из полиамида-6 и в течение 48 и 72 часов. Общее количество клеток, количество прикрепленных клеток, а также их метаболическую активность определяли с помощью МТТ-теста, конфокальной и сканирующей электронной микроскопии. Мы показали, что оба вида ММСК и HUVES могут быть успешно культивированы на каркасах из полиамида-6. При этом ММСК жировой ткани проявляли наиболее высокую метаболическую активность и занимали большую

площадь носителя, по сравнению с ММСК костного мозга. HUVES проявляли более низкую метаболическую активность и занимали меньшую площадь носителя по сравнению с другими типами клеток. Таким образом, можно говорить о биологической совместимости каркасов из полиамида-6 и человеческих клеток, а также рекомендовать ММСК из различных источников для создания тканеинженерных конструкций с использованием полиамида-6.

Исследование проведено при поддержке гранта РФФИ (No. 14-45-00018).

3D-ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ДВУХ-КОМПОНЕНТНОГО МАТРИКСА И НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Баклаушев В.П.¹, Тимашев П.С.^{2,3}, Кальсин В.А.¹, Бардакова К.Н.^{2,3}, Минаев Н.В.², Советников Н.Н.¹, Коноплянников М.А.¹, Котова С.Л.^{1,4}, Самойлова Е.М.¹, Аверьянов А.В.¹

1. ФГБУ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Москва, Россия.
2. Институт фотонных технологий ФНИЦ Кристаллография и фотоника РАН, Москва, Россия.
3. Институт регенеративной медицины Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова, Россия, Москва, Россия.
4. Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия. serpoff@gmail.com

Хорошо известно, что нейрогенез во многом определяется составом микроокружения и физико-химическими свойствами межклеточного матрикса. В то же время, применение нейральных стволовых клеток для лечения травм спинного мозга и инсультов существенно ограничено именно невозможностью создать необходимое для нейрорегенерации микроокружения вследствие возникновения глиомезодермального рубца в области повреждения. Целью настоящего исследования была разработка комбинированного субстрата для получения 3D-тканеинженерных конструкций из нейральных стволовых клеток на основе биорезорбируемого полимерного каркаса и «жидкого» матрикса, представляющего собой производное обогащённой тромбоцитами плазмы.

Полученные по оригинальной технологии нейральные стволовые клетки (НСК), экспрессирующие Sox2, нестин и маркёры как нейрональной (бета-III-тубулин, MAP2, NF200) так и глиальной (GFAP, O4) дифференцировки культивировали на биodeградируемом полимерном скаффолде с заданными размерами пор и 3D-структурой, синтезированном из хитозана и гиалуроновой кислоты (в соотношении 1:3) методом двухфотонной фотополимеризации. Для создания оптимального микроокружения, в 3D-конструкции вместе с НСК вводили «жидкий матрикс», представляющий собой смесь белков внеклеточного матрикса, компонентов крови и факторов роста и способный в присутствии внеклеточного Ca²⁺ образовывать гель. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия полученных тканеинженерных конструкторов показала, что в оптимизированных

условиях наблюдается наилучшее пространственное распределение НСК в полимерном скаффолде и активная дифференцировка в нейрональном и глиальном направлении. Полученные результаты могут способствовать созданию биосовместимых 3D-тканеинженерных конструкций для восстановления периферических нервов и поврежденного спинного мозга. Работа выполнена при поддержке РФФ (грант 16-15-10432).

WHAT CELLS ARE ABLE TO RENEW AND REGENERATE THE MAMMALIAN MYOCARDIUM?

Belostotskaya G.B.1,2, Golovanova T.A.1,², Nerubatskaya I.V.¹, Galagudza M.M.²

1. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation.

2. Federal Almazov North-West Medical Research Centre, St. Petersburg, Russian Federation.

gbelost@mail.ru

For several years there has been an open question whether resident cardiac stem cells (CSCs) or adult cardiomyocytes (CMs) are responsible for renewal of adult mammalian myocardium. Some authors argue for the role of CSCs, while others point out that formation of new CMs may happen due to division of pre-existing mature CMs, ignoring the fact that the size of these proliferating CMs is very small and is not typical for mature CMs. Although the latter was stressed by Leri A. et al. [2015], some authors continue to insist that myocardium of adult mammals contains small neonatal-like CMs able to proliferate, and that their numbers increase during hypoxia [Kimura W. et al., 2015] and ischemia [Tang X-L. et al., 2016]. In our experiments with an *in vitro* culture of rat cardiac cells, we identified and described for the first time the phenomenon of intracellular development of CSCs in mature CMs with formation of «cell-in-cell structures» (CICs). Recently, we have confirmed reproducibility of our results and existence of this phenomenon in rats of different age groups, 1-year-old bull, adult mice and humans, analyzing freshly isolated myocardial cell suspensions, as well as tracked the release of transitory amplifying cells (TACs), positive for CSC-antigens and cardiac markers, from CICs. Moreover, we demonstrated the several time increases in the amount of CICs after exposure of *in vitro* cultures to hypoxia and acidosis, i.e. these conditions stimulate intracellular development of CSCs. These observations suggest that TACs, released from the intracellular capsule of CICs in our studies, are those same small immature neonatal-like CMs that were described by others in hypoxic condition and ischemia. Our data strongly suggest that TACs, released from CICs, are present as a very rare cell population in adult and old rats. Therefore, we assume that TACs are important for renewal of myocardium during ontogenesis. TACs should be considered as the major source of cells that can reduce myocardial damage in adult mammals with various pathologies of the cardiovascular system. In conclusion, precise and exhaustive analysis of the phenomenon of intracellular development of CSCs, CICs and TACs will pave the way for cell technologies of new generation in regenerative medicine and significantly advance the field.

УСПЕХИ И ПРОБЛЕМЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ (ОПЫТ ИНЦ РАН)

Блинова М.И.¹

1. Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия.
mira.blinova@mail.ru

Клеточные технологии базируются на использовании культивируемых клеток для создания в условиях *in vitro* аналогов поврежденных тканей или органов, необходимых для трансплантации в ситуации отсутствия соответствующего материала. Разработки клеточных технологий аккумулируют результаты фундаментальных исследований клеточной биологии, химии, материаловедения, новых методов исследования. Разработка клеточных технологий в Институте цитологии РАН (ИНЦ РАН) началась в 1991 г. с целью создания многослойного пласта кератиноцитов человека для лечения критических и сверхкритических ожогов. Поставленная задача решена рядом методических модификаций по сравнению с первой зарубежной разработкой. Также были разработаны клеточные продукты и с культивируемыми дермальными фибробластами - эквивалент дермальный и эквивалент полной кожи. Для полноценной клеточной технологии кроме клеток необходимо наличие нескольких составляющих - субстрат для адгезии клеток, белковый компонент и фактор, способствующий дифференцировке клеток. Одной из первых проблем является наличие источника ткани, из которого могут быть выделены клетки для культивирования. Первоначальные предположения об использовании аутологичных клеток не всегда выполнимы, поскольку их состояние зависит от целого ряда факторов - возраст, сопутствующие заболевания, недостаточность этого материала и т.п. В технологиях с клетками кожи опыт ИНЦ РАН свидетельствует о возможности применения донорского материала. Теория стволовых клеток представляет возможность использовать клетки костного мозга. Получение клеток необходимой дифференцировки требует в свою очередь фундаментальных исследований по поиску оптимальных условий дифференцировки в конкретный тип клеток. Следующее условие - субстрат для адгезии и функционирования клеток. В ИНЦ РАН ведутся разработки резорбируемых скаффолдов различной структуры на основе полимолочной кислоты. Для эффективного и безопасного применения клеточных продуктов необходимы процедуры стандартизации всех этапов их приготовления. В ИНЦ РАН формируется банк дермальных фибробластов человека, охарактеризованных по международным стандартам, и создается технологическая база производства клеточных продуктов по стандартам GMP. Часть результатов получена при выполнении проекта РФФ № 14-50-000687.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В КОМПОЗИТЕ С БИОСИТАЛЛОМ НА ПРОЦЕССЫ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ IN VITRO

Гайдаш А.А.¹, Виноградова Т.И.¹, Александрова С.А.², Копелев П.В.²,
Касьянова Е.С.², Нащекин А.В.³, Конников С.Г.³, Мухин И.С.⁴, Лысенко
Л.Н.⁵, Елагина И.А.⁵, Блинова М.И.²

1. Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.
2. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
3. ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, Россия.
4. Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия.
5. ООО ПК «Элкор», Санкт-Петербург, Россия.

В экспериментах *in vitro* по формированию элементов костной ткани использованы композиты из мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК) костного мозга кроликов, биоситалла (остеоиндуктивный материал), белкового компонента (коллаген I типа) и остеогенной дифференцировочной среды. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) показано, что уже на ранних сроках культивирования (3 сут) биоситалл провоцирует кальцификацию ММСК с интенсивным образованием в среде пористых, химически активных частиц остеоида. На более поздних сроках мелкие частицы остеоида сливаются в крупные пористые формы, а гранулы биоситалла покрываются минерально-органической пленкой. В композите «ММСК+Коллагеновый гель» в остеогенной среде клетки активно секретируют матриксные везикулы, сливающиеся и отделяющиеся от клеток. На поверхности клеток развиваются пластинчатые структуры эмбрионального типа. При культивировании ММСК в остеогенной среде с биоситаллом интенсифицируется минерализация коллагеновых волокон. Структурной особенностью таких волокон, расположенных на гранулах биоситалла, является зернистость их поверхности. Размер зерен совпадает с размером домена коллагеновых фибрилл 1 типа. Подобную структуру имеют только волокна, расположенные на гранулах биоситалла. Они четко ориентируются вокруг кальций фосфатных микрозерен, опутывая их рыхлой сетью. Показано, что клетки продуцируют собственный коллаген. В композите «ММСК+Коллаген+Биоситалл» под влиянием биоситалла за счет выхода кальций фосфатов стимулируется образование ретикулофиброзных и пластинчатых органотипических структур, происходит деструкция ММСК с их распадом. Это позволит снять риски иммунных конфликтов, связанных с имплантацией клеток.

Клиническое значение результатов - перспектива разработки технологии получения остеоидов и костных пластинок для имплантации пациенту. Результаты получены при выполнении проекта РФФ №14-50-00068.

АУТОЛОГИЧНЫЕ КЛЕТКИ В ПРАКТИКЕ ДЕТСКОЙ КОМБУСТИОЛОГИИ

Докукина Л.Н.¹, Арефьев И.Ю., Прохорова Ю.Н.

1. ФГБУ «ПФМИЦ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия.
luda.dokukina@yandex.ru

Цель: Восстановление и стимуляция регенерации кожного покрова у детей с ожоговой травмой в результате применения аутологичных клеток в сочетании с фибриновым клеем «Тиссукол».

Материалы и методы. С 2011 по 2016 годы с применением аутологичных клеток кожи нами пролечено 123 пациента в возрасте от 5 месяцев до 15 лет с ожогами II-III степени на площади от 4 до 80% поверхности тела. Площадь закрываемой аутоклетками поверхности составила от 100 до 800 см кв. Аутологичные клетки выделяли из предварительно забранного трансплантата, и в аутоплазме пациентов использовали при дермальных, пограничных либо при глубоких ожогах. При глубоких ожогах (38 пациентов) клеточную взвесь наносили на раневые поверхности после выполнения некрэктомии на площади от 1 до 15% поверхности тела. После туалета дермальных ожоговых ран, либо некрэктомии глубоких, осуществляли гемостаз, наносили клеточную суспензию на раневые поверхности и производили её фиксацию фибриновым клеем «Тиссукол» и прозрачным перфорированным индифферентным раневым покрытием типа «Реперен».

Результаты. При поверхностных ожогах на первой перевязке на 5-7 сутки отмечали законченную эпителизацию ран и пациентов выписывали из стационара. При нанесении аутоклеток на «пограничные» ожоговые раны, срок эпителизации составил от 6 до 8 дней. В эти же сроки при глубоких ожогах раневое покрытие оставляли на ране и удаляли его по мере восстановления кожного покрова. Сроки восстановления кожного покрова при глубоких ожогах составили от 7 до 14 дней, в зависимости от площади ран. Койко-день при пограничных и глубоких ожогах составил $14,5 \pm 3,5$ суток.

Образование гранулирующих ран на месте трансплантации клеток после некрэктомии (на части закрываемой поверхности) наблюдалось у 2 пациентов (5,2%), которым в последующем была выполнена свободная кожная пластика.

Заключение и выводы: полученные результаты продемонстрировали хороший эффект во всех случаях применения аутологичных клеток кожи. Сочетанное применение фибринового клея «Тиссукол» с трансплантацией аутологичных клеток минимизирует оперативное вмешательство и является альтернативой свободной пересадки кожи при глубоких ожоговых поражениях, особенно при дефиците донорских участков.

ОПЫТ ОРГАНИЗАЦИИ БАНКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Дрык С.И.¹, Зуенок Н.Н., Колбасина М.Н.

1. УЗ «9 городская клиническая больница» г. Минска.

Лечение злокачественных заболеваний крови с применением современных программ полихимиотерапии приводит к длительной аплазии костномозгового кроветворения. Для его восстановления необходима трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Источником ГСК для трансплантации может стать пуповинная кровь (ПК). По состоянию на 2016 г. было проведено более 30 000 таких трансплантаций. Основными заболеваниями, в терапии которых используется ГСК ПК, является острый лейкоз, лимфома, апластическая анемия, талассемия, и др. Использование ПК обладает рядом преимуществ, что обуславливает необходимость развития эффективных методов получения и хранения клеток ПК.

В 2010 г. на базе лаборатории сепарации и замораживания костного мозга «УЗ 9-я ГКБ» г. Минска был создан персональный банк пуповинной крови, в котором к настоящему времени заготовлено 1256 образцов. После сбора клетки ПК должны быть выделены и криосохранены в течение 24 часов. Оптимальная температура краткосрочного хранения клеток составляет $+18-23^{\circ}\text{C}$. При этом их жизнеспособность не снижается.

Сохранение стволовых клеток - многоэтапный процесс. Все манипуляции с клетками осуществлялись в стерильных ламинарных боксах. Клетки выделялись двумя методами: методом седиментации с использованием 6% гидроксипропилацетата и на автоматическом сепараторе клеток «SEPAX» фирмы BIOSAFE (Швейцария). До сегодняшнего момента заложено на хранение 276 образцов, выделенных на автоматическом сепараторе «SEPAX», что составляет 38% от общего количества криосохраненных клеток за соответствующий период ($n=726$); в 2016 г. этот показатель составил 50 %.

Оптимизированы параметры криоконсервации клеток .

Параллельно образцы тестировались на количество ядродержащих клеток (ЯСК), CD^{34+} , на бактериальные и вирусные инфекции (CMV IgG R; Anti-HBcor; HBSAg Qual; Anti-HCV; Syphilis; HIV Ag/Ab; Anti-Toxoplasma Ig G методом ИФА анализа). Бактериальный пророст имел место в 6% случаев забора ПК. Определяли группы крови по системе ABO и резус-фактор.

Объем получаемой ПК от одного донора ограничен. В соответствии с нашими данными ($n=1256$) медиана (25%-75% квартили) объема составила 66 мл (50-85). В нашем исследовании количество образцов ПК, имеющих

объем < 40 мл, составило 12% от общего количества (n=1256), более 80 мл - 29%. Остальные образцы (41%) имели объемы от 40 до 80 мл.

Стволовые клетки относятся к ЯСК, поэтому важной характеристикой ПК является количество ЯСК, которое в настоящий момент является стандартной оценкой трансплантата из ПК. Медиана количества ЯСК в полученных нами образцах ПК (n=1256) составила $8,4 \times 10^8$ ЯСК (6,3-11,3). По данным литературы необходимое количество для трансплантации ЯСК в образце ПК должно составлять не менее $3,0 \times 10^7$ на килограмм веса реципиента. Мы проанализировали абсолютное количество лейкоцитов в каждой единице собранной ПК с учетом данного параметра.

Наибольшее количество образцов ПК (51,3%) содержит $7,5-15,0 \times 10^8$ ЯСК, что достаточно для трансплантации реципиенту весом 25,5-50 кг. Образцы, содержащие $< 7,5 \times 10^8$ лейкоцитов, также возможно использовать для трансплантации у детей массой тела до 25 кг. Таким образом, при принятии решения о целесообразности хранения малых объемов ПК, следует ориентироваться на количество ЯСК в образце. При этом следует отметить, что медиана концентрации ЯСК в цельной ПК была $7,88 \times 10^6$ /мл (6,4 - 9,83).

Для изучения гемопозитического потенциала ПК в 1256 образцах произведен подсчет клеток с иммунофенотипом CD^{34+} . Медиана количества таких клеток в криосохраненном образце составила $2,7 \times 10^6$ (1,61- 4,65). При этом медиана процента CD^{34+} клеток составила 0,32 (0,2-0,48).

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ПК является одним из перспективных и доступных источников ГСК. При решении вопроса о возможности криозамораживания ПК следует ориентироваться не на объем, а на абсолютное количество ЯСК.

ВОЗМОЖНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ СПОНТАННОЙ ТРАНСФОРМАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Енукашвили Н.И.², Александрова Л.В.¹, Золина Т.¹, Котова А.¹, Супильникова О.В.^{1,3}, Старунова З.¹, Пономарцев Н.В.², Пономарцев С.В.², Щепина М.², Сказина М.¹, Айзенштадт А.А.^{1,3}

1. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург.
2. ФГБУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.
3. Северо-Западный государственный медицинский университет им. Мечникова.
nie@newmail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) представляют собой перспективный материал для клеточной терапии. Однако, вопрос биологической безопасности биомедицинских клеточных продуктов до сих пор вызывает опасения, несмотря на большое количество проведенных клинических испытаний. На сегодня остаются невыясненными окончательно ключевые вопросы безопасности клеточных продуктов на основе МСК: 1) туморогенны ли они; 2) обладают ли они онкогенностью; 3) способны ли участвовать в обеспечении роста опухоли, сосудов внутри нее и метастазировании. МСК, как и любые клетки, извлекаемые из своей ниши и переводимые в условия культивирования *in vitro*, подвергаются значительным изменениям: изменяется иммунофенотип, пролиферативная активность. Происходит снижение экспрессии p53. Усиливается экспрессия некоторых генов семейства Нох. Этим изменениям предшествуют эпигенетические изменения (в частности, быстрое деметилирование ДНК). Также происходит изменение работы некодирующей части генома - активизируется транскрипция тандемноповторяющейся ДНК. Все эти изменения сходны с таковыми, происходящими при начале малигнизации клеточной культуры, хотя и выражены слабее по сравнению с линиями опухолевого происхождения. В наших исследованиях экспрессия Нох генов, и некодирующей ДНК возвращалась к первоначальному уровню при появлении в первичных культурах МСК признаков старения. В целом, МСК человека более генетически стабильны - при экспансии *in vitro* хромосомные перестройки в них наблюдаются реже, чем у грызунов. Кроме того, генетическая нестабильность в МСК человека гораздо реже приводит к онкотрансформации клеток. На сегодня нет экспериментов, надежно подтверждающих возможность спонтанной онкотрансформации МСК человека. Ряд работ были опровергнуты или отозваны в связи с обнаруженной контаминацией другими клеточными культурами. Тем не

менее, вопрос о возможности спонтанной онкотрансформации МСК человека и механизме повышенной устойчивости к ней остается открытым.

Несмотря на то, что сегодня нет убедительного подтверждения возможности спонтанной онкотрансформации МСК, необходима разработка методов оценки клеточного препарата в целом, а не на основе выборки клеток. Существующие сегодня тесты нуждаются в модификациях.

Работа поддержана грантом РНФ 15-15- 20026, Программой Президиума РАН Молекулярная и клеточная биология, грантами РФФИ № 16-34-01163, 16-34-00603.

РАЗРАБОТКА НОВОГО БИОМАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ПРОДУКТОВ СЕКРЕЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Ефименко А.Ю.¹, Сагарадзе Г.Д.², Григорьева О.А.², Макаревич П.И.^{1,2}, Нимирицкий П.П.², Басалова Н.А.³, Кирпатовский В.И.¹, Камалов Д.М.¹, Охоботов Д.А.², Камалов А.А.^{1,2}, Акопян Ж.А.^{1,2}, Ткачук В.А.^{1,2}

1. МГУ имени М.В. Ломоносова, Медицинский научно-образовательный центр, Москва, Россия.
2. МГУ имени М.В. Ломоносова, факультет фундаментальной медицины, Москва, Россия.
3. МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия. *efimenkoan@gmail.com*

Для успешного развития регенеративной медицины необходимы разработка и внедрение новых биоматериалов, максимально приближенных по своим биологическим и физико-химическим свойствам к тканям человека. Ключевую роль в процессах репарации и регенерации тканей играют стволовые и прогениторные клетки, в частности мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (ММСК), причем показано, что способность ММСК стимулировать восстановление тканей при повреждении обусловлена, в первую очередь, секрецией клетками растворимых биологически активных факторов, внеклеточных везикул и компонентов внеклеточного матрикса. Было показано, что кондиционированная среда (КС), содержащая продукты секреции ММСК, на многих экспериментальных моделях оказывает эффекты, сравнимые с действием самих клеток, при этом обладая определенными преимуществами точки зрения биобезопасности и скорости трансляции для клинического применения, что указывает на перспективность ее использования для создания новых лекарственных средств и биоматериалов для стимуляции регенерации тканей.

Нами предложен оптимизированный протокол получения КС ММСК жировой ткани человека с использованием клинически релевантных реагентов и материалов. Мы разработали несколько вариантов нового биоматериала на основе КС ММСК жировой ткани человека и коллагена в качестве биоактивного носителя, которые были протестированы на различных моделях *in vitro*. Биоматериал в виде геля для инъекций был апробирован на модели нарушения сперматогенеза (экспериментальный крипторхизм) у крыс. С помощью ряда функциональных и гистологических исследований была показана способность разработанного биоматериала стимулировать восстановление сперматогенеза при введении под белочную оболочку яичек. Кроме того, мы обнаружили, что терапевтический эффект при ис-

пользовании биоматериала с высокой дозой КС ММСК жировой ткани человека сравним с эффектом при введении самих клеток.

Работа выполнена на базе Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова и факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение о субсидии № 14.607.21.0045 от 22 августа 2014 г., уникальный идентификатор прикладных научных исследований (проекта) RFMEFI60714X0045).

THE REGULATION OF MTOR-SIGNALING BY fgfr/ERK pATHWAY IN MOUSE pRIMED EMBRYONIC STEM CELLS

Kaminskaya A.N.¹, Pospelov V.A.¹

1. Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russia.
kaminskayaan@mail.ru

It has been shown that LIF is necessary to ensure prolonged proliferation of mESCs, while retaining their pluripotent properties. Recently, we showed that LIF removal activates mTOR signaling pathway in mESCs implying that LIF/STAT is involved in negative control of mTOR. LIF-depleted mouse ESCs undergo a transition from the LIF/STAT3-supported pluripotent state to the FGFR/ERK-committed primed-like state through activation of mTOR signaling. Here, we focused at the role of AZD4547, an inhibitor of FGFRs, in regulation of mTOR-signaling pathway in primed mESCs after LIF-depletion.

Firstly, we studied the cell cycle parameters of LIF-depleted mESCs. LIF removal by itself does not affect the cell cycle parameters. Flow cytometry data showed that after exposure of LIF- mESCs with AZD4547 (2 h, 500 nM) the proportion of G1 phase-engaged cells was the same with 1-5% increase of S-phase cells. According to MTT-test, 2 h-exposure of mESCs with AZD4547 (500nM - 1µM) leads to a slight increase of cell viability. Thus, FGFR activation caused by LIF withdrawal can be reversed by the EGFR inhibitor retaining the cell cycle parameters and cell viability. However, suppression of FGFRs by exposure of mESCs with AZD4547 (500 nM, 24 h) decreases level of p-mTOR (Ser2448) and its targets - S6 ribosomal protein (Ser235/236) and p-4EBP1 (Thr35/47). Importantly, an exposure mESCs with PD0325901 (MEK/ERK1/2 inhibitor) leads to an increase of pS6 (Ser235/236) and p4EBP1 (Thr35/47), indicating that ERK1/2 are not the only kinase involved in mTOR downregulation after AZD4547 treatment.

Using immunofluorescent staining we showed that after exposure of mESCs with AZD4547 (2 h, 500 nM) an accumulation of LC3 and p62 in large clusters in the cytoplasm of mESCs takes place, presumably, in autophagosomes. At the same time in control mESCs untreated with AZD4547, LC3 is mainly detected in small granules, while p62 is uniformly distributed in the cytoplasm of mESCs.

According to western blot, LC3 and p62 increase in mESCs after AZD4547 exposure (2 h, 500 nM). There is also the conversion of LC3-I to LC3-II.

Therefore, exposure of primed LIF-depleted mESCs with AZD4547 down regulates mTOR-signaling pathway independently of ERK1/2. Correspondingly, autophagy initiated by LIF withdrawal intensifies in the presence of AZD4547, nevertheless, as evidence by accumulation of p62, it is unable to reach to a final stage.

ГЕНДЕРНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ММСК ЖИРОВОЙ ТКАНИ И КОСТНОГО МОЗГА. ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ АППЛИКАЦИИ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Китаева К.В.¹, Журавлева М.Н.², Архипова С.С.¹, Гилазиева З.Е.¹, Салафутдинов И.И.², Шепелев А.Д.³, Тенчурин Т.Х.³, Чвалун С.Н.³, Маккиарини П.¹

1. OpenLab «Биоинженерии и регенеративной медицины (BioReM)», Казанский федеральный университет, Казань, Россия.
2. OpenLab «Генных и клеточных технологий», Казанский федеральный университет, Казань, Россия.
3. Курчатовский институт, Москва, Россия.
olleth@mail.ru

Растущий интерес к персонализированной медицине рождает спрос на новые, более точные исследования особенностей организма для подбора целесообразной терапии. Одними из наименее изученных аспектов в данной области являются особенности физиологии, строения и биологического потенциала стволовых соматических клеток в свете половых и возрастных различий организмов-доноров. Исследования последних лет подтверждают существование особенностей физиологических параметров мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), обусловленных полом. При этом в литературе практически отсутствуют данные по морфологии стволовых клеток, а также фенотипическим особенностям ММСК взятых у разнополых и разновозрастных доноров. Таким образом, исследования гендерных особенностей стромальных стволовых клеток представляются актуальными.

Целью нашего исследования являлось сравнение морфологии свежесыведенных мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани на ультраструктурном уровне, а также анализ фенотип и ческих особенностей ММСК и их дифференцировочного потенциала. Исследование было проведено на разнополых и разновозрастных крысах породы Wistar с использованием методик электронной микроскопии, иммуноцитохимии и проточной цитофлуориметрии. Выявленные различия в морфологии и дифференцировочных параметрах клеток, выделенных у разнополых и разновозрастных доноров, могут быть использованы при выборе стратегии создания тканеинженерных конструкций. Исследование проведено при поддержке гранта РФФ (No. 14-45-00018).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ЛЮМИНАЛЬНОЙ ФОРМОЙ БОЛЕЗНИ КРОНА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ - 7 ЛЕТ НАБЛЮДЕНИЯ

Князев О.В.¹, Фадеева Н.А.¹, Лицинская А.А.¹, Ручкина И.Н.¹, Каграманова А.В.¹, Бабаян А.А.¹, Болдырева О.Н.¹, Конопляников А.Г.², Лазебник Л.Б.³, Парфенов А.И.¹

1. ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр Департамента здравоохранения Москвы».
2. Медицинский радиологический научный центр МЗ и СР РФ, г.Обнинск, Россия.
3. Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова.
Oleg7@bk.ru

Антицитокиновая терапия анти-ФНО- α препаратами способствует достижению стойкой ремиссии болезни Крона (БК). Для лечения БК также используют мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

Цель: изучить долгосрочную эффективность (7 лет) терапии мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга у больных с люминальной формой болезни Крона (БК).

Материалы и методы. 80 больных БК с люминальной формой БК (терминальный илеит, колит и илеоколит) разделили на две группы. Первая группа больных в возрасте от 19 до 58 лет (Me-29) (n=34) получала культуру МСК по схеме (0-1-2-3, затем каждые 26 недель). Вторая группа больных БК (n=46) в возрасте от 20 до 62 лет (Me-28) получала стандартную противовоспалительную терапию препаратами 5-аминосалициловой кислоты (5-АСК), глюкокортикостероидами (ГКС) и иммуносупрессорами (ИС). Оценку эффективности терапии по уровню индекса активности болезни Крона (ИАБК) осуществляли через 12, 24, 36, 48, 60, 72 и 84 месяцев от начала терапии.

Результаты. Среди больных 1-й группы рецидив заболевания в течение 12 месяцев наблюдения произошел у 4/36 пациента (11,76%). Во 2-й группе рецидив заболевания произошел у 5/46 (10,8%) (p=0,82). Через 24 месяца в группе больных (1-я группа), получающих МСК, рецидив заболевания произошел у 6/34 (17,6%). Во 2-й группе больных рецидив заболевания у 19/27 (41,3%) (p=0,044). Через 36 месяцев в 1-й группе больных рецидив заболевания у 11/34 (32,3%). Во 2-й группе рецидив у 29/46 (63,1%) (p=0,01). Через 48 месяцев в 1-й группе, получающих МСК, рецидив у 15/34 (44,1%). Во 2-й группе рецидив у 33/46 (71,7%) (p=0,023). Через 60 месяцев в 1-й рецидив у 19/34 (55,9%). Во 2-й группе рецидив у 40/46 (86,9%) (p=0,004).

Через 72 месяца в 1-й группе рецидив у 25/34 (73,5%). Во 2-й группе рецидив заболевания у 45/46 (97,8%) ($p=0,001$). Через 84 месяца в 1-й группе рецидив заболевания произошел у 29/34 (85,3%). Во 2-й группе больных рецидив заболевания произошел у 46/46 (100,0%) ($p=0,011$).

Выводы. Трансплантация МСК способствует поддержанию более длительной клинической ремиссии у больных с люминальной формой болезни Крона по сравнению с терапией ГКС/ИС.

ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ И АЗАТИОПРИНА НА КЛИНИЧЕСКОЕ ТЕЧЕНИЕ БОЛЕЗНИ КРОНА

Князев О.В.¹, Фадеева Н.А.¹, Каграманова А.В.¹, Лищинская А.А.¹,
Бабаян А.Ф.¹, Болдырева О.Н.¹, Конопляников А.Г.², Парфенов А.И.¹

1. ГБУЗ «Московский клинический научно-практический центр
Департамента здравоохранения Москвы».

2. Медицинский радиологический научный центр МЗ и СР РФ,
г.Обнинск, Россия.

Oleg7@bk.ru

Одним из новых перспективных методов лечения болезни Крона (БК) является биологическая терапия с применением мезенхимальных стромальных клеток (МСК) костного мозга. В ряде случаев одновременно с МСК, больные получают сопутствующую иммуносупрессивную терапию. Установлено, что иммуномодулирующие препараты (азатиоприн, метотрексат, 6-меркаптопурин, инфликсимаб), независимо от концентрации, не влияют на жизнеспособность, дифференцировку, фенотип и способность МСК подавлять пролиферацию мононуклеарных клеток периферической крови. Однако исследования, проведенные Huang HRet al. продемонстрировали, что ИФЛ оказывал минимальное воздействие на пролиферацию МСК, апоптоз и их клеточный цикл, в то время как азатиоприн ингибировал пролиферацию клеток и индуцировал апоптоз МСК in vitro.

Целью нашей работы явилось изучение влияния комбинированного применения МСК костного мозга и азатиоприна (АЗА) на клиническое течение БК.

Материалы и методы. 34 больных с люминальной формой БК разделили на две группы. Первая группа больных в возрасте от 19 до 58 лет (Me-29) ($n=15$) получала противовоспалительную терапию с применением культуры МСК 2 млн/кг+АЗА 2 мг/кг. Вторая группа больных БК ($n=19$) в возрасте от 23 до 60 лет (Me-31) получала МСК в соответствии с рекомендуемой схемой (без АЗА). Культура МСК вводилась трижды в течение месяца с интервалом 1 неделя через 6 месяцев с момента первого введения МСК. Исходный средний индекс активности болезни Крона (ИАБК) в первой группе составил $337,6 \pm 17,1$ баллов, во второй - $332,7 \pm 11,0$ баллов ($p=0,3$). Оценку эффективности терапии осуществляли через 12, 24 и 36 месяцев.

Результаты. Через 12 месяцев в первой группе больных БК рецидив произошел у 1 больного БК (6,6%), во второй - у 2 (10,5%) (ОР-0,63, 95% ДИ 0,06-6,34, $p=0,82$). Средний ИАБК в первой группе больных БК со-

ставил $99,9 \pm 10,8$ баллов, во второй $-100,6 \pm 12,1$ баллов ($p=0,8$). Через 24 месяца в первой группе больных рецидив БК произошел у 3 пациентов (20,0%), во второй - у 4 (21,05%) (ОР-0,95,95% ДИ 0,25-3,61, $p=0,72$). Средний ИАБК в первой группе больных БК составил $133,2 \pm 28,3$ баллов, во второй $-120,8 \pm 15,5$ баллов ($p=0,2$). Через 36 месяцев в первой группе больных БК рецидив произошел у 5 больных БК (33,3%), во второй - у 6 (31,6%) (ОР-1,06, 95% ДИ 0,4-2,8, $p=0,79$). Средний ИАБК в первой группе больных БК составил $139,9 \pm 23,4$ баллов, во второй $-141,7 \pm 20,8$ баллов ($p=0,9$). Вывод. В течение трех лет наблюдения у пациентов, получавших одновременно МСК и АЗА и у пациентов, получавших только МСК, не было отмечено разницы в частоте рецидивов и активности БК.

НОВАЯ МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ РЕПАРАЦИИ IN VITRO НА ОСНОВЕ ЛАЗЕРНОЙ МИКРОХИРУРГИИ КЛЕТОЧНЫХ СФЕРОИДОВ

Кошелева Н.В.^{1,3}, Сабурина И.Н.^{1,4}, Ильина И.В.², Зурина И.М.¹, Горкун А.А.¹, Роскова А.Е.³, Овчинников А.В.², Агранат М.Б.², Репин В.С.^{1,4}

1. ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия.
 2. ФГБУ науки Объединенный институт высоких температур РАН, Москва, Россия.
 3. Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия.
 4. ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия последипломного образования» Минздрава России, Москва, Россия.
- n_kosheleva@mail.ru*

Репарация и восстановление тканей играют важную роль в нормальном функционировании организма. Механизмы репарации и проблемы её нарушения до конца не изучены. Исследование *in vitro* с применением простых моделей монослойных культур ограничивает возможность изучения этого процесса. Целью исследования стало создание новой доступной и воспроизводимой модели для изучения процессов репарации *in vitro* с использованием 3D культуры - клеточных сфероидов и современных методов лазерной микрохирургии.

Исследование проведено на сфероиде из мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга человека, полученных на агарозных планшетах с лунками (Microtissue, США). Сфероиды повреждали наносекундным лазерным диссектором PalmCombiSystem (Zeiss, Германия). Параметры лазерного излучения (длина волны 355 нм, частота импульсов 100 Гц, длительность импульсов 2 нсек, максимальная энергия в импульсе 9 мкДж, время воздействия 10-30 сек) были оптимизированы для эффективной микродиссекции заданной области поверхностной и внутренней зон сфероида. Наблюдение за процессом репарации проводили, используя прижизненную цейтраферную фотосъемку в системе Cell-IQ (CM Technologies, Финляндия). Через 1, 6, 24, 72 и 168 часов сфероиды анализировали с применением методов световой, флуоресцентной и электронной растровой микроскопии.

В течение 3 мин после воздействия лазерных импульсов наблюдали спонтанное раскрытие краев разреза на угол более 180°. Повреждение приводило к гибели клеток в месте разреза, нарушалась исходная структура сфероидов, форма клеток раневой поверхности менялась с вытянутой уплощенной на округлую. В незатронутой повреждением части сфероидов сохранялось строение с уплощенными поверхностными клет-

ками и полигональными клетками внутренней зоны. Через сутки происходило частичное восстановление сфероидов, клетки в поверхностных слоях начинали расплываться. Восстановление исходной структуры сфероидов с характерными несколькими поверхностными слоями уплотненных черепицеобразно расположенных клеток и полигональными клетками внутренней зоны происходило через 7 сут после микродиссекции за счет ремоделирования выживших клеток.

Разработанная модель повреждения клеточных сфероидов с применением лазерной микродиссекции открывает новые возможности для изучения механизмов регенерации и репарации *in vitro*.

ФОРМИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДОВ С МСК. РОЛЬ АЛЛОГЕННЫХ КЛЕТОК

Кузнецова Д.С.^{1,2}, Тимашев П.С.³, Родимова С.А.^{1,2}, Баграташвили В.Н.⁴, Загайнова Е.В.¹

1. НИИ биомедицинских технологий, НижГМА Минздрава России, Н. Новгород, Россия.
2. ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, Россия.
3. Институт регенеративной медицины, Первый МГМУ им.И.М.Сеченова, Москва, Россия.
4. ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Россия.
daria.s.kuznetsova@gmail.com

Перспективной стратегией устранения костных дефектов в тканевой инженерии является внедрение трехмерных скаффолдов с подсаженными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Существует много исследований, показывающих улучшение костной регенерации при участии МСК, однако до сих пор остается неясно, какую роль в имплантатах выполняют подсаженные клетки. Таким образом, целью данной работы стало *in vivo* исследование участия аллогенных МСК в формировании костной ткани и сосудов в имплантатах.

МСК выделяли из костного мозга трансгенных GFP(+)/C57/Bl6 и обычных C57/Bl6 мышей. Клетки подсаживали на скаффолды, полученные с помощью метода поверхностного селективного лазерного спекания. Эксперимент включал три группы животных. Первая группа состояла из обычных мышей, которым были имплантированы скаффолды с GFP(+)/МСК. Во второй группе GFP(+)/трансгенным мышам внедряли скаффолды с GFP(-)/МСК. Третья контрольная группа представляла собой GFP(+)/трансгенных мышей со скаффолдом без клеток. Такая перекрестная модель позволяла четко разделить и визуализировать аллогенные клетки и собственные МСК.

Показано, что спустя 6 недель после имплантации подсаженные МСК остаются на скаффолдах и сохраняют свою активность, при этом собственные МСК в месте дефекта не обнаруживаются. Часть скаффолда начинает замещаться костной тканью. К 12 неделе большая часть скаффолда резорбируется, дефект заполняется восстановленной костной тканью, однако в месте дефекта все ещё можно обнаружить подсаженные МСК. Кроме того, в имплантатах присутствует большое количество сосудов, сформированных из подсаженных МСК. Таким образом, показано, что аллогенные МСК в течение длительного времени способны сохранять свою активность на скаффолдах, а так же участвовать в формировании костной ткани и сосудов в месте дефекта.

ОПУХОЛЬ-АССОЦИИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ ПРИ ХИМИЧЕСКИИ ДУЦ И РОВ АН НОМ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Лыков А.П.¹, Кабаков А.В., Бондаренко Н.А., Казаков Щ.В., Райтер Т.В.,
Суровцева М.А., Ким И.И., Повещенко О.В., Стрункин Д.Н., Повещенко А.Ф.

1. НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, РФ.
aplykov2@mail.ru

Введение. Рак молочной железы (РМЖ) основная причина смертности женщин во всем мире. Для изучения патогенеза и терапии РМЖ используют экспериментальную модель на животных.

Цель исследования - изучить фенотип и роль опухоль-ассоциированных мезенхимальных стромальных клеток (ОА-МСК) при экспериментальной модели РМЖ.

Материалы и методы исследования. РМЖ индуцировали пятикратным введением 2,5 мг/кг N-метил-N-нитрозомочевины (МНМ) в область 2-ой молочной железы. Через 24-недели оперативно удаляли опухоль молочной железы и ткань молочной железы на противоположной стороне, измельчали ножницами и дезагрегировали в 0,1% растворе коллагеназы I типа. ОА-МСК от 3 пассажа фенотипировали с использованием CD90 и CD45 на проточнике FACSCanto II.

Собственные результаты. Клетки, выделенные из тканей молочных желез, имели фибробластоподобную форму. Клетки экспрессировали маркер МСК CD90, а также маркер гемопоэтических клеток CD45. В группе животных с индуцированным РМЖ показано увеличение клеток с фенотипом CD45+CD90-, CD45+CD90+ и CD45-CD90+ МСК по сравнению с контрольной группой и МСК из молочных желез с противоположной стороны ($p < 0,05$). Количество CD45-CD90+ МСК в группе животных с не возникшим РМЖ увеличено в сравнении с контролем и снижено в сравнении с количеством МСК из молочных желез с противоположной стороны ($p < 0,05$). Кроме этого, количество CD45+CD90+ МСК снижено по сравнению с контролем и количеством МСК с противоположной стороны ($p < 0,05$).

Заключение. Таким образом, установлено, что количество ОА-МСК возрастает при МНМ-индуцированном РМЖ.

EVALUATION OF A NEW BIOARTIFICIAL SCAFFOLD FOR TISSUE ENGINEERING OF ESOPHAGUS IN RATS

Mavlikeev M.O.¹, Titova A.A.¹, Abyzova M.S.¹, Zhuravleva M.N.¹, Kitaeva K.V.¹,
Gilyazieva Z.E.¹, Arkhipova S.S.¹, Shepelev A.D.², Tehchurin T.Kh.², Chvalun
S.N.², Macchiarini P.¹

1. Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine (BioReM), Kazan
(Volga region) Federal University, Kazan, Russia.

2. Laboratory of the Polymer materials, Research Center "KurchatovInstitute"
Moscow, Russia.

mmavlikeev@gmail.com

Every year, thousands of patients are diagnosed with esophageal diseases for which esophageal replacement is needed. Tissue engineering offers a valid alternative to the complex harvesting of patients' own organs like stomach or colon. At present, there is a wide range of biocompatible artificial polymers, which may be of major interest for esophageal tissue engineering. We electrospun polyamide-6 2D scaffolds that mimic native esophageal biomechanics and tested them first *in vitro* we showed their complete biocompatibility with human and rats stromal cells. In this study, we evaluate the feasibility to transplanted 0.5 or 0.196 cm² large 2D scaffolds orthotopically to rebuilt a large mucosal, surgically created, defect in male Sprague-Dawley rats. Rats' cervical esophagi were opened longitudinally and their ventral surface was resected and replaced either unseeded or seeded (30,000 rat adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) or bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs)) scaffolds of similar size using interrupted sutures. Scaffolds' cell kinetics was assessed using genetically modified MSCs (lentivirus encoding red fluorescent protein HcRed - LV-HcRed). Sham animals had only longitudinal muscularis incision.

Animals were followed for a period of 6 months. Surgical specimen were obtained at 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 months postoperatively (n=3 animals per time point in each experimental group) where histopathological analysis (H&E, Mallory trichrome) with immune-histochemistry (CD34, CD68, collagen IV, pan-cytokeratin, desmin, MHCfast/slow, Ki-67) was performed. To study rats immunological response, blood serum samples were obtained before operation and after 1,3,7,14,21 days postoperatively and serum cytotoxicity was determined. To study kinetics of seeded cells, *in vivo* imaging (IVIS Spectrum In Vivo Imaging System, PerkinElmer, USA) of operated rats was performed at weekly intervals postoperatively. Preliminary results of this study will be reported on the conference. This work was funded by a Russian Science Foundation grant (No. 14-45-00018).

МЕТОДЫ ТЕРАПИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА: ГЕНЕТИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ И СОЗДАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ИХ ОСНОВЕ

Макаревич П.И.^{1,3}, Ткачук В.А.^{1,2}, Парфёнова Е.В.^{2,3}

1. Лаборатория генно-клеточной терапии, Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ им. М.В. Ломоносова.
2. Лаборатория генных и клеточных технологий в медицине, Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова.
3. Лаборатория ангиогенеза, Российский кардиологический научно-производственный комплекс МЗ РФ.
pmakarevich@mc.msu.ru

Существующая в регенеративной медицине проблема повышения ее эффективности может быть решена путем повышения паракринной активности клеток или уменьшения негативного влияния их суспензионного состояния. Для этой цели нами активно разрабатывались подходы, связанные с доставкой генетической информации в прогениторные и стволовые клетки, а также использование клеточных пластов -тканеинженерных конструкций, состоящих из жизнеспособных клеток и белков внеклеточного матрикса.

Разработанные нами методы увеличения продукции VEGF165 в мезенхимных стромальных клетках жировой ткани (МСК ЖТ) с помощью вирусных конструкций показали свою высокую эффективность на животных моделях ишемических заболеваний. Генетически модифицированные МСК ЖТ значительно превосходили нетрансдуцированные клетки по способности стимулировать ангиогенез и регенерацию ткани. Вторым аспектом повышения эффективности стало создание клеточных пластов - тканеинженерных конструкций, позволяющих уменьшить неблагоприятное влияние суспендированного состояния клеток при трансплантации. Нами было установлено, что клеточные пласты могут быть собраны из МСК ЖТ, эндотелиоцитов, c-kit+ стволовых клеток сердца. Состав, структура и терапевтическая активность клеточных пластов была оценена на моделях ишемии скелетных мышц и миокарда: в ходе данных опытов установлено, что доставка клеток в виде пластов значительно превосходит инъекцию суспензий, а их терапевтическая эффективность также может быть увеличена с помощью вирусной трансдукции.

В докладе также будут представлены данные, касающиеся механизмов реализации эффектов обоих подходов, и результаты исследования взаимодействия клеточных пластов и организма реципиента после их трансплантации в эксперименте.

NOTCH SIGNALING IN DIFFERENTIATION: THROUGH FUNDAMENTAL MECHANISMS TO UNDERSTANDING CARDIOVASCULAR PATHOLOGY

Malashicheva A.B.¹

1. Federal Almazov Medical Research Centre, Saint-Petersburg State University.

The pathogenesis of congenital and acquired heart defects and related pathological conditions, such as bicuspid aortic valve, aortic valve calcification, aortic aneurysm, myocardial remodeling remains poorly understood at molecular and cellular level. In this regard, the search for potential therapeutic targets remains difficult. A common feature of these heart defects is the shift in the direction of cellular differentiation in the postnatal period. The role of evolutionary and conservative Notch signaling pathway responsible for specialization of cells during embryogenesis is well-studied in embryogenesis and also in the neoplasia. In the last decade it became clear that this signaling pathway plays an important role in postnatal maintenance of tissues homeostasis as well, and in response to stress. Apparently, damage in intercellular Notch signaling could lead to abnormalities in tissues homeostasis, in particular in cardiovascular system and thus lead to the pathologies associated with a shift of cell differentiation. Understanding the mechanisms of this shift using stem cell models and identification of the damaged links in the chain of signal transduction will lead to the identification of areas of search for potential therapeutic targets for the treatment of such diseases. In this regard Notch signaling pathway is one of the promising directions of the fundamental research.

КЛИНИЧЕСКИЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ЛЕЧЕНИЯ КРИТИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ НИЖНИХ КОНЕЧНОСТЕЙ АЛЛОГЕННЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Орехов П.Ю.¹, Аверьянов А.В.¹, Баклаушев В.П.¹, Чупин А.В.¹,
Коноплянников М.А.¹, Кальсин В.А.¹

1. Федеральный Научно-Клинический Центр ФМБА России,
Москва, Россия.
orekhovp@mail.ru

Актуальность: необходимость поиска новых эффективных технологий лечения критической ишемии нижних конечностей (КИНК) у неоперабельных больных.

Цель: оценить безопасность и эффективность терапии КИНК трансплантацией донорских мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Методы: МСК (фенотип CD44+CD73+CD90+CD45-CD34-, по данным FACS), выделяли из костного мозга здоровых доноров стандартным методом. Трансплантация МСК (1 млн. на 1 кг массы тела) была проведена 15 больным с КИНК: выраженные боли покоя у всех больных, ограниченные трофические расстройства (класс 5 по Rutherford) у 10 больных, обширный некроз стопы и голени - у 2 больных (класс 6 по Rutherford). Средний возраст 62 года. Ранее 10 из 15 больных были многократно оперированы на стороне пораженной конечности. Многоэтажное поражение артериального русла было выявлено у всех больных. 12 больным трансплантация МСК в мышцы голени проведена в качестве самостоятельного метода лечения, 3 больным - внутриаартериально в сочетании с артериальной реконструкцией для улучшения путей оттока.

Результаты: всеми больными отмечена удовлетворительная переносимость процедуры трансплантации клеток, серьезных непосредственных осложнений не было. За период наблюдения (от 3 до 36 мес.) летальных исходов не отмечено. Конечность сохранена у 9 больных с полным или практически полным купированием болевого синдрома при среднем сроке наблюдения 11 месяцев (от 6 до 24 мес.). Полное заживление трофических расстройств у 7 больных, значительное заживление - у 2. Осложнений в отдаленном периоде не было.

Выводы: применение донорских МСК костного мозга человека безопасно и эффективно, позволяя сохранить конечность у 60% больных при среднем сроке наблюдения 11 мес.

Примечание: исследование было проведено при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (Грант 16-15-10432).

ВЛИЯНИЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА РЕПАРАТИВНЫЙ ОСТЕОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС

Орлов А.А.¹, Григорян А.С.², Сысоев С.Д.¹, Зурина И.М.¹, Горкун А.А.¹, Кошелева Н.В.^{1,4}, Устинова Е.Е.¹, Сабурова И.Н.^{1,3}

1. НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия.
2. ЦНИИСиЧЛХ, Москва, Россия.
3. Российская медицинская академия последипломного образования, Москва, Россия.
4. Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия.
doctororlov@gmail.com

Одной из актуальных проблем ортопедической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является дефицит костной ткани в области альвеолярного гребня. В терапии костных дефектов с применением аутологичного материала наибольшим преимуществом обладают мультипотентные мезенхимные стволовые клетки жировой ткани (ММСКЖТ), содержащие как популяцию мультипотентных клеток, так и васкулярную фракцию, которая способствует быстрому восстановлению кровоснабжения поврежденного участка. Целью исследования стало совершенствование методов восполнения дефицита костной ткани в области альвеолярного отростка с использованием костного аутооттрансплантата и аутологичных ММСКЖТ.

Работа была выполнена на 40 самцах крыс породы Вистар на экспериментальной модели повреждения нижней челюсти. Животных разделили на 2 равные группы: основную, в которой в области повреждения в пространство между костным аутооттрансплантатом (фрагмент большеберцовой кости) и материнской костью (нижняя челюсть) вводили суспензию ММСКЖТ, и группу сравнения, в которой животным клетки не вводили. На 21, 60, 120 и 180 сутки после операции проводили гистоморфометрический анализ костных блоков, включающих костный аутооттрансплантат и фрагмент материнской кости.

В группе сравнения отсутствовали гистоморфологические проявления остеогенеза, напротив, развивались дегенеративные изменения - на всех сроках наблюдения между костным аутооттрансплантатом и материнской костью располагалась широкая зона фиброзной соединительной ткани.

В основной группе уже на 21сут в области материнской кости и по краям аутооттрансплантата появлялись признаки активного остеогенеза. Новая костная ткань, объединяющая аутооттрансплантат и материнскую кость в единую структуру, формировалась к 120сут. Введение ММСКЖТ в основной группе за счет индукционного паракринного действия спо-

собствовало активации процесса остеогенеза и ремоделирования новых костных структур в пространстве между аутокостным трансплантатом и материнской костью.

Проведенное исследование открывает новые возможности совершенствования методов восполнения дефицита костной ткани в области альвеолярного отростка, предлагает комплексное сочетание костного аутооттрансплантата и аутологичных ММСКЖТ для оптимизации имплантологических операций.

МОДИФИКАЦИИ GDNF И ИХ РОЛЬ В ПРОЦЕССАХ НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК

Павлова Г.В.¹, Шамадыкова Д.В.¹, Гаврилова Н.А.², Куст Н.Н.¹,
Пантелеев Д.Ю.¹, Ревещин А.В.¹

1. ИБГ РАН, Москва, Россия.
2. МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, Россия.
lkorocnkin@mail.ru

Считается, что GDNF стимулирует нейральную дифференцировку предшественников и участвует в выживании дофаминэргических нейронов среднего мозга. На моделях болезни Паркинсона было показано, что ресGDNF может предотвращать нейротоксически спровоцированную гибель дофаминэргических нейронов и способствует восстановлению их функциональной активности. Однако проведение клинических испытаний показало отсутствие обнаруженного эффекта у человека. Причина отсутствия эффекта может быть связана с использованием не той изоформы GDNF, которая необходима именно для стимуляции нейральной дифференцировки прогениторных клеток. На данный момент показано, что у человека ген GDNF кодирует два варианта GDNF мРНК, ре-(α)рго-GDNF и укороченный ре-(β)рго-GDNF. Причем было обнаружено, что ре-(α)рго-GDNF, секретируется через аппарат Гольджи, а ре-(β)рго-GDNF, секретируется в основном через секреторные везикулы. Вероятно, ре-(α)рго-GDNF необходим для выживания нейронов в норме, тогда как ре-(β)рго-GDNF необходим как SOS система регенерации при травматической гибели нейронов или при нейродегенеративных заболеваниях. Для исследования значимостирго области для быстрого транспорта и изменения индуктивных свойств фактора нами были сделаны несколько вариантов модифицированных GDNF. Модифицированные GDNF были трансплантированы в клетки HEK293. Анализ эффективности модификаций GDNF как стимулятора нейральной дифференцировки прогениторных клеток проводился на культивируемых эмбриональных спинальных ганглиях крысы и на PC12. Было обнаружено, что удалениерго области значительно повышает эффект GDNF, как нейрального индуктора. In vivo была использована мышинная модель болезни Паркинсона с использованием МРТР. Имплантация клеток, продуцирующих mGDNF в каудатум-путамен, сглаживала симптомы болезни Паркинсона в тестах на двигательную активность.

Также была проанализирована способность mGDNF влиять на процесс регенерации эпителиально-стромального повреждения. Было показано,

что mGDNF стимулирует пролиферативную активность эпителиальных клеток и кератоцитов, способствует активной эпителиальной миграции и плотной адгезии эпителиальных клеток, принимает активное участие в формировании стромального нервного сплетения. Работа поддержана РФФ № 14-15-00942.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Плехова Н.Г.¹, Ляпун И.Н.², Дробот Е.И.²

1. Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия.
2. НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.П. Сомова, Владивосток, Россия.
pl_nat@hotmail.com

Для повышения эффективности хирургических реконструктивных процедур, связанных с регенерацией костной ткани в области обширных повреждений, применяются различные стратегии, включая использование аллопластических и аллогенных материалов, дистракционный остеогенез и создание остеокондуктивного матрикса. В качестве перспективной альтернативы традиционным технологиям является метод тканевой инженерии, направленный на конструирование новых и эффективных материалов, обладающих более совершенными физиологическими свойствами. Остеопрогениторные клетки, включая мезенхимные стволовые клетки (МСК) и циркулирующие стволовые клетки успешно используются для разработки подобных технологий. Биоактивные МСК из костного мозга способны в зависимости от свойств межклеточного матрикса динамично изменять экспрессионно-секреторный профиль, что проявляется в последующем в их регуляторной функции в месте ремоделирования ткани. Так, при инициализации процесса воспаления опосредованный сигнал патоген-ассоциированных молекул через Toll-подобные рецепторы побуждает МСК к миграции в очаг повреждения. В ответ на активацию рецепторов происходит секреция этими клетками в межклеточное пространство провоспалительных цитокинов и хемокинов, что определяет их регуляторное влияние на клетки иммунной системы. В дальнейшем, при секреции ростовых факторов МСК проявляются антиапоптозные, ангиогенные и антифиброзные эффекты и поддерживают миграцию, пролиферацию и дифференцировку фибробластов, резидентных и рекрутированных в очаг воспаления прогениторных клеток, что играет значительную роль в регуляции начальных этапов репарации. Решение ряда вопросов связанных с изучением морфофункциональных особенностей МСК в зависимости от свойств межклеточного матрикса и условий их эффективного проникновения в зону повреждения позволит подойти к разработке принципиально новых индивидуальных подходов к реконструированию костной ткани.

ТРАНСКРИПТЫ ДИСПЕРГИРОВАННЫХ ПОВТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Подгорная СИ^{1,2,3}, Енукашвили Н.И.¹, Адонин Л.С.^{1,3}

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург.
2. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург.
3. Дальневосточный федеральный университет, Владивосток.
opodg@yahoo.com

Основную массу генома составляет повторяющаяся ДНК. Экзоны составляют не более 2% всего генома. Основную же часть (не менее 50%) составляют повторяющиеся последовательности на основе мобильных элементов (transposable elements, TE).

Роль TE в функционировании и эволюции изучается. Многие транскрипты TE входят в класс длинных некодирующих РНК (long noncoding RNA, lncRNA). TE lncRNA могут модулировать ландшафт генома. У мыши репрограммирование после оплодотворения включает в себя этап активации транскрипции LINE последовательностей. LINE-1 транскрипты важны в оогенезе и сперматогенезе. Роль эндогенных ретровирусов в поддержании стволовости показана более определенно. У человека со стадии от 4 клеток до ранней бластоцисты наблюдается экспрессия эндогенного ретровируса HERV-K. lncHERV-K обладают способностью связывать мРНК клетки, регулируя их трансляцию. У мыши из популяции внутренней клеточной массы (ВКМ) выделены клетки, неэкспрессирующие Oct-4, но содержащие lncRNA MERV-L. В отличие от остальных клеток ВКМ, эти клетки являются не мультипотентными, а тотипотентными (дающими начало как тканям плаценты, так и тканям трех зародышевых листков). HERV-H и MERV-L являются маркерами наименее дифференцированных субпопуляций эмбриональных стволовых клеток. При подавлении активности HERV-H (~8% генома) эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки утрачивают плюрипотентность и приобретают сходство с фибробластами. lncRNA HERVH (1) рекрутируют транскрипционные коактиваторы в регуляторные ДНК-связывающие комплексы и в энхансерные участки генома; (2) взаимодействуют с Oct-4. Поддержание стволовости вирусом HERV-H происходит через lncRNA; кроме этого, HERV-H ДНК связывает факторы поддержания плюрипотентности и обеспечивает их распространение и передачу. Каждая стадия раннего эмбриогенеза человека характеризуется определенным набором экспрессируемых ретровирусов и, видимо, других lncRNA. Роль lncRNA на основе диспергированных повторов, в первую очередь ретровирусов, в раннем эмбриогенезе и поддержании стволовости эмбриональных и

индуцированных плюрипотентных стволовых клеток является горячей точкой современной эпигенетики.

Работа поддержана грантом РНФ15-15-20026, Программой Президиума РАН Молекулярная и клеточная биология, грантом РФФИ 11-04-01700-а.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЖИРОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУТЁМ МЕТИЛИРОВАНИЯ САЙТА H3K27

Попов Б.В.^{1,2}, Верещагина Н.А.¹, Сушилова Е.Н.¹, Петров Н.С.¹

1. Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

2. СЗГМУ им. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия.

borisvp478@gmail.com

Жировые клетки формируются из мезенхимных стволовых клеток (МСК) в результате дифференцировки, инициируемой при выборе клеточной судьбы в пользу «жировой» в ущерб «костной». Выбор клеточной судьбы МСК регулируется путём взаимодействия белков семейства pRb и Polycomb (PcG), механизм которого недостаточно хорошо изучен. Белки PcG тормозят транскрипцию генов путём метилирования на промоторах тканеспецифических генов жировой дифференцировки (ЖД) с помощью метилтрансферазы Ezh2 сайта H3K27, деметилирование которого осуществляется деметилазой Utx. Цель настоящей работы заключалась в изучении роли метилирования гистона H3K27 в эпигенетической регуляции ЖД МСК мышилинии 10T1/2. Клетки индуцировали к ЖД путём культивирования в ростовой среде, содержащей индометацин, дексаметазон, 3-изобутил-1-метилксантин и инсулин, с последующей её оценкой спустя 0, 7, 10 и 14 сут после начала индукции с помощью световой микроскопии клеток, окрашенных красителем масляным красным, и спектрофотометрического измерения количества красителя, экстрагированного из окрашенных МСК. Мы нашли, что МСК обладают высокой чувствительностью к индукции ЖД, к 14 сут большая часть популяции клеток накапливают жировые вакуоли, что сопряжено с повышением уровня белков pRb, p130, Bmi1, Utx и снижением уровня Ezh2. Стабильная экспрессия микроРНК (мкРНК) против гена BMI семейства PcG снижает, но не отменяет уровень ЖД. Результаты ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) показывают, что при индукции ЖД в МСК повышается экспрессия PPAR γ 2, ADIPOQ (адипонектина), RB, p130, UTX, но не Ezh2. Инактивация BMI снижает экспрессию PPAR γ 2, ADIPOQ, RB, p130 и UTX. Путём иммунопреципитации хроматина (ChiP) в недифференцированных клетках выявляется высокий уровень p130, Bmi1, Ezh2, связанных с промотором PPAR γ 2, который снижается в условиях ЖД. Utx, напротив, слабо взаимодействует с промотором PPAR γ 2 в недифференцированных клетках, но в условиях ЖД связывание этого белка с хроматином возрастает более чем в три раза. Связывание p130, Bmi1, Ezh2, Utx с промотором RUNX2 при ЖД значительно не изменяется. В недифференцированных клетках с инактивированным BMI

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЙ СТАТУС X-ХРОМОСОМ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Стригина Е.В.^{1,2,3}, Шевченко А.И.^{1,3,4}, Захарова И.С.^{1,3,4}, Закиян С.М.^{1,2,3,4}

1. Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия.
2. Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия.
3. Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н.Мешалкина, министерство здравоохранения Российской Федерации, Новосибирск, Россия.
4. Институт химической биологии и фундаментальной медицины, Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия. apple-rain@mail.ru

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека 46,XX имеют разный эпигенетический статус X-хромосом, который нестабилен и может изменяться в ходе культивирования. В нашей работе мы показали, что условия культивирования способны оказывать влияние на эпигенетический статус X-хромосом в ПСК человека. В частности, показано, что от условий культивирования зависит обогащение неактивной X-хромосомы триметилированным гистоном H3 по лизину K9 (H3K9me3). Установлено, что в ПСК человека, культивируемых на матригеле, X-хромосома, обогащенная H3K9me3, ассоциирована с гистонметилтрансферазой SETDB1 и белком KAP1, ответственным за её привлечение на хроматин. Из ЭСК линии NuES9 получены маркированные зелёным флуоресцентным белком плюрипотентные клоны единичных клеток. Выявлено, что в экспрессирующем зелёный флуоресцентный белок клоне X-хромосомы демонстрируют весь спектр эпигенетических состояний, характерный исходной культуре клеток, при этом доля клеток с X-хромосомой, обогащенной H3K9me3, статистически значимо не отличается от таковой в исходной культуре. Таким образом, можно заключить, что гетерогенность клеток по эпигенетическому статусу X-хромосом в культуре NuES9 связана с постоянно идущими в ней эпигенетическими процессами, затрагивающими одну из двух X-хромосом.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В РАЗВИТИИ ФИБРОЗА ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ТКАНЕВЫХ ДЕФЕКТОВ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

Суздальцева Ю.Г.¹, Лагарькова М.А.

1. ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, г. Москва, Россия. suesue@bk.ru

Известно, что у взрослых людей заживление тканевых дефектов различных органов после повреждения чаще всего происходит с образованием фиброзной ткани (рубца). В настоящее время известно, что мезенхимные стволовые клетки (МСК) являются ключевыми участниками формирования фиброзной ткани за счет избыточной секреции коллагена и дифференцировки в миофибробласты. Абляция периваскулярной субпопуляции МСК из очага повреждения приводит к существенному улучшению качества регенерации поврежденной ткани. В тоже время у плодов человека до третьего семестра гестации регенерация тканей после повреждения происходит полным восстановлением первоначальной архитектуры и функциональной активности. Молекулярные механизмы «фетальной регенерации» в настоящее время остаются практически неизвестными. Целью настоящей работы являлось создание клеточных моделей на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека для изучения молекулярных механизмов регенерации тканей на ранних стадиях развития человека.

Культивируемые фибробласты из биоптата кожи человека были репрограммированы факторами Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc с использованием рекомбинантных вирусов Сендая в плюрипотентное состояние, сходное с эмбриональными клетками. Полученные ИПСК имели характерную морфологию, экспрессировали поверхностные антигены SSEA4, TRA-1-60/81, транскрипционные факторы OCT4, NANOG, SOX2 и были способны дифференцироваться в клетки эктодермы, эндодермы и мезодермы. Полученные ИПСК под воздействием специальных условий были дифференцированы в клетки ранней мезодермы, которые экспрессировали маркеры BRY, Snail, TBX6, MIXL1 и поверхностный антиген CD90, но не экспрессировали поверхностные антигены, характерные для зрелых МСК, CD105 и CD73. Далее посредством культивирования в стандартной среде эти клетки были дифференцированы в зрелые МСК, способные к адгезии к пластиковой поверхности, экспансии в культуре, экспрессирующие поверхностные маркеры CD105, CD90 и CD73 и не экспрессирующие CD45, CD34 и HLA-DR, способные дифференцироваться в клетки жировой, костной и хрящевой ткани.

Сравнение функциональной активности предшественников МСК и зрелых МСК в условиях моделирования воспалительного микроокружения позволит изучать особенности механизмов регенерации тканей на ранних стадиях развития организма, позволяющие идентифицировать ключевые молекулы и терапевтические мишени для уменьшения развития фиброза тканей при заживлении после повреждения.

ARE MESENCHYMAL STROMAL MICROVESICLES ALONE POTENTIALLY USEFULL FOR CELL SEEDING OF BIOARTIFICIAL SCAFFOLDS?

Titova A.A.¹, Mavlikeyev M.O.¹, Abyzova M.S.¹, Zhuravleva M.N.¹, Kitaeva K.V.¹, Gilyazieva Z.E.¹, Arkhipova S.S.¹, Shepelev A.D.², Tehchurin T.Kh.², Chvalun S.N.², Macchiarini P.¹

1. Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine (BioReM), Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia.
 2. Laboratory of the Polymer materials, Research Center "Kurchatov Institute", Moscow, Russia.
- anjerika@list.ru*

Tissue engineering may be a potential alternative to routine organ replacement of the native esophagus. This approach requires the seeding of a biological or bioartificial scaffold with stromal cells (SC) to promote cell differentiation into tunica mucosa and muscularis and graft survival. Limitations of cell usage are risks of malignancy development, and challenge in obtaining sufficient quantities of autologous SC. It was recently hypothesized that the positive effects of the SC transplantation is due to paracrine effects on the microenvironment via secretion of bioactive molecules. Thus, a possible promising approach could be the use of microvesicles which do not carry genetic information and capable of carrying encapsulated proangiogenic and other bioactive molecules. The aim of our study was to investigate the feasibility, differentiation potentials and biocompatibility of microvesicles of human bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) and adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) and polyamide-6 scaffold for bioartificial esophagus tissue engineering.

Microvesicles were isolated using the cytochalasin B from human BMMSCs and ADMSCs labeled with lentivirus LV-HcRed encoding red fluorescent protein HcRed. Microvesicles were seeded on polyamide-6 scaffold for 48 and 72 hours in an amount equivalent to 20000 cells. Total amount and morphology of attached microvesicles were determined by confocal and scanning electron microscopy. Dynamics of growth factors and cytokines release from microvesicles was determined in the culture medium using cytokine Assay. Preliminary results of this study will be reported on the conference.

This work was funded by a Russian Science Foundation grant (No. 14-45-00018).

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ПРОЦЕССАХ ОБНОВЛЕНИЯ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

Ткачук В.А.^{1,2}

1. Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.
2. Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова.
tkachuk@fbm.msu.ru

Обновление органов и тканей человеческого тела идет постоянно и происходит, в основном, за счет пролиферации зрелых соматических клеток или дифференцировки специфических прогениторных и стволовых клеток. Данные процессы имеют огромный резерв, за счет чего в течение жизни человека в организме обновляются тонны клеток, поддерживающих физиологическое обновление и регенерацию при повреждении. Среди стволовых клеток взрослого организма выделяются мультипотентные мезенхимные стволовые клетки (МСК), обладающие способностью к самообновлению и регенеративным потенциалом. Участвуя в обновлении стромального компонента ткани, МСК способны не только к дифференцировке в остециты, хондроциты, адипоциты и фибробласты, но и обладают мощной паракринной активностью и способны восстанавливать матрикс, необходимый для роста сосудов, нервных окончаний и формирования архитектуры зрелой ткани. Помимо этого МСК секретируют широкий спектр иммуномодулирующих цито- и хемокинов, митогенных факторов роста, протеаз и их ингибиторов, регулирующих процессы восстановления и обновления ткани.

В докладе будут обсуждаться механизмы участия МСК в регенеративных процессах, в том числе за счет так называемого «горизонтального переноса» генетической информации. Последний реализуется при участии внеклеточных везикул, секретируемых МСК и содержащих помимо белков кодирующие (мРНК) и не кодирующие микроРНК, а также транскрипционные факторы. Их участие в регенерации связывают с дедифференцировкой зрелых клеток, которая, как предполагается, приводит к пролиферации терминально дифференцированных кардиомиоцитов, гепатоцитов, клеток нервной системы. По схожему механизму МСК способны активировать перепрограммирование клеток, минуя стадию плюрипотентности, что открывает совершенно новый взгляд на роль МСК в процессах восстановления тканей и органов.

ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Томилин А.Н.¹

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
a.tomilin@incras.ru

Плюрипотентные стволовые клетки, которым будет посвящен доклад, выдвинулись на передний край клеточной биологии и, возможно, всей биомедицины в связи с широчайшими возможностями применения этих клеток для моделирования заболеваний и тканезаместительной терапии у человека. Уникальной особенностью этих клеток является способность к самоподдержанию и дифференцировке во все клеточные типы тканей взрослого организма (за исключением двух внезародышевых клеточных типов - трофэктодермы и первичной эндодермы). В докладе будет освещена история развития данного направления биологии, приведены результаты современных достижений в области плюрипотентных стволовых клеток. Заметная доля этих исследований посвящена центральному регулятору клеточной плюрипотентности, POU-доменному белку Oct4, необходимому как для поддержания, так и для индукции клеточной плюрипотентности. В докладе будет затронута важная тема, касающаяся приложения фундаментальных знаний о плюрипотентных стволовых клетках в практической медицине.

РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА ПРАВИЛ НАДЛЕЖАЩЕЙ ПРАКТИКИ ПО РАБОТЕ С БИМЕДИЦИНСКИМИ КЛЕТОЧНЫМИ ПРОДУКТАМИ

Тулина М.А.¹, Пятигорская Н.В.

1. ФГБОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» МЗ РФ, Москва.
mari_bel_90@mail.ru

В научно-исследовательской работе предложен проект Правил Надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами (БКП), разработанный на основе международного опыта и с учетом требований федерального законодательства.

Материалы и методы: анализ официальных документов регулирования качества продуктов на основе человеческих клеток и тканей ряда ведущих стран мира (Европа, США, Канада, Япония, Сингапур, Южная Корея) и федерального законодательства в сфере обращения БКП; публикаций по системам обеспечения качества клеточных технологий.

Результаты: На основе анализа международного опыта, зарубежной правоприменительной практики разработан гармонизированный проект Правил надлежащей практики (Правил GMP/GTP) по работе с БКП. Представлены основные критерии оценки пригодности доноров биоматериала. Изучено понятие «прослеживаемости» клеток и тканей и предложена схема ее обеспечения в жизненном цикле БКП. Рассмотрена методология системы менеджмента качества на производстве, отмечены главные ее составляющие: наличие СОПов, квалифицированного персонала и Уполномоченного лица, промежуточный контроль, анализ рисков, валидация и ведение отчетности всех процессов и процедур. Дано четкое определение понятию «процессинг» и предложены требования по обеспечению качества на данном этапе. Особое внимание уделено комплексному методу кодирования БКП для идентификации, маркировки и передачи информации о БКП. Предложена система мониторинга серьезных нежелательных явлений и реакций, возникающих соответственно при производстве и клиническом применении БКП. Кроме того, в работе описаны особенности программы разработки БКП, доклинических и клинических исследований, учитывающие биологическую природу продукта.

Выводы: Представленный в работе проект Правил Надлежащей практики по работе с БКП разрабатывается в рамках Фармацевтической системы качества и исполнения требований Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах». Ожидается, что данный проект будет являться основным документом, регулирующим качество БКП на всех стадиях их создания, а при проведении доклинических исследований эффективности и безопасности будет учтена специфика работы с клеточным материалом.

НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА CD34+ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В МЕГАКАРИОЦИТЫ И ТРОМБОЦИТЫ

Тюмина О.В.¹, Ключников Д.Ю.¹, Трусова Л.М.¹, Волчков С.Е.¹, Языкова М.Ю.²

1. ГБУЗ «Самарский областной медицинский центр Династия», Самара, Россия.
2. ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», Самара, Россия.
centr123@bk.ru

Введение. Большой интерес сегодня вызывают работы по направленной дифференцировке стволовых клеток человека в мегакариоциты и тромбоциты в условиях *ex vivo*. Этот интерес обусловлен в первую очередь вероятными перспективами внедрения подобных биотехнологий в клиническую практику, но также и возможностью детального изучения всех этапов сложного процесса тромбоцитопоэза. Результатами усилий многих научных коллективов во всем мире стали новые данные о регуляции тромбоцитопоэза, экспрессии генов, вовлеченных в этот процесс и др. Проведены испытания полученных *ex vivo* мегакариоцитов и их предшественников для лечения тромбоцитопении на моделях низших приматов, запущены первые клинические испытания на людях. Однако, эффективность получения мегакариоцитов и тромбоцитов *ex vivo* гораздо ниже, чем *in vivo*, и технологии в достаточной мере удовлетворяющей запросам для клинического применения нет. В представленной работе предложен однофазный протокол по получению мегакариоцитов и из CD34+ ГСК в условиях *ex vivo*.

Цель работы: разработка протокола по дифференцировке CD34+ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) пуповинной крови (ПК) человека в тромбоциты.

Материалы и методы. CD34+ клетки были выделены из мононуклеарной фракции пуповинной крови доноров без патологии гемопоэза, давших свое полное согласие. Выделение проходило с помощью метода позитивной иммуномагнитной селекции. Культивирование ГСК проводилось на среде на основе IMDM с 20% BIT 9500 и модифицированным BS1 коктейлем цитокинов (концентрация SCF увеличена в два раза до 2 нг/мл) в 24 луночных планшетах при 37°C и 5%CO₂. На 4 сутки была проведена замена половины среды, а на 7 сутки общая концентрация клеток была доведена до 3,0-3,4x10⁵кл/мл. Оценка клеточной популяции проводилась с помощью микроскопии и проточной цитометрии с использованием антител к CD34 и CD41а маркерам.

Результаты. Отмечено некоторое увеличение количества CD34+ клеток (более чем в 5 раз) к 10 суткам культивирования. Появление мегака-

риоцитарных предшественников (CD34+/CD41a+) происходило уже на 7 сутки, а к 10 суткам их количество достигало $36,8 \pm 0,5\%$ клеток от общей популяции. Созревание мегакариоцитов и образование большого количества протромбоцитов было хорошо заметно уже на 12 сутки. Проведенный морфологический анализ показал идентичность полученных в эксперименте тромбоцитов с тромбоцитами венозной крови. Предложенный протокол может быть в дальнейшем использован как для изучения отдельных моментов тромбоцитопоэза так и для развития технологий по получению тромбоцитов человека для клинических целей.

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ У КРЫС ПОСЛЕ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА И ИНТРАТЕКАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ КЛЕТОК КРОВИ ПУПОВИНЫ, ТРАНСДУЦИРОВАННЫХ АДЕНОВИРУСОМ

Шаймарданова Г.Ф.^{1,2}, Башанкаев С.Д.², Измайлов А.А.², Фадеев Ф.О.², Соколов М. Е.², Исламов Р.Р.²

1. КИББ КазНЦ РАН, г. Казань, Россия.
2. ГБОУ ВПО Казанский ГМУ Минздрава России, г. Казань, Россия.
gulnara_kzn@rambler.ru

Мировые исследования клеточной и генно-клеточной терапии травмы спинного мозга подтвердили эффективность этих подходов. В большинстве случаев достигается положительное влияние на нейрорегенерацию. Наши предыдущие исследования выявили специфичность получаемых результатов, зависящую от типа клеток, природы экспрессируемого фактора при однократной трансплантации в область травмы. По критерию оценки произвольных движений в открытом поле (тест «BBB») показатель восстановления функции нарастал в следующем ряду: клетки крови пуповины человека → клетки обонятельной выстилки человека → клетки крови пуповины человека, трансфицированные плазмидой pBud-VEGF-FGF2 → клеток крови пуповины человека, трансдуцированные AdV-GDNF. Анализ сохранности ткани показал, что оптимальный эффект достигается при прямой генной терапии плазмидой pBud-VEGF-FGF2. В то же время количество сохранных миелиновых волокон максимально при трансплантации клеток крови пуповины человека, трансдуцированных AdV-GDNF. Поскольку ни один из изученных способов терапии не дает полного восстановления двигательной активности, актуальным остается поиск оптимальных комбинаций нейротрофических факторов и максимально неинвазивных способов их доставки.

Цель экспериментов: оценить эффективность посттравматической регенерации спинного мозга крысы в условиях прямой и опосредованной клетками крови пуповины человека, доставки генов нейрональной молекулы клеточной адгезии (Ad-NCAM1), сосудистого эндотелиального фактора роста (Ad-VEGF121) и глиального нейротрофического фактора (Ad-GDNF) на модели дозированной контузионной травмы при интра-текальном введении.

Существенная положительная динамика восстановления двигательной активности животных при интра-текальном введении клеток крови пуповины, модифицированных комбинацией Ad-NCAM1, Ad-VEGF121, Ad-GDNF, и прямой доставки данных вирусов свидетельствует, что такая

комбинация является наиболее эффективной по сравнению с ранее использованными нами экспериментальными подходами. Работа поддержана грантом РФФ 16-15-00010.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВЛИЯНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ РЕКОНСТРУКЦИИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ.

Юдинцева Н.М.¹, Нащекина Ю.А.¹, Блинова М.И.¹, Шейхов М.С.², Орлова Н.В.², Виноградова Т.И.², Муравьев А.Н.², Самусенко И.А.³.

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
2. СПбНИИ фтизиопульмонологии Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия.
3. ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС России, Санкт-Петербург, Россия.
yudintceva@mail.ru

В настоящее время для реконструкции нефункционирующего мочевого пузыря (МП) применяются операции по его замещению фрагментами ЖКТ, что нередко приводит к различным осложнениям. Применение методов клеточной терапии может способствовать улучшению результатов лечения многих патологических состояний в урологии. Наиболее привлекательными для этих целей являются мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (МСК). Потенциальные риски применения в клинической практике связывают с пролиферативной способностью клеток, риском развития инфекционных осложнений вследствие их иммуносупрессивного действия. Однако проведенные исследования показывают отсутствие негативного влияния МСК на развитие осложнений и возникновение опухолей. В связи с этим, применение клеточной терапии, в частности инъекции суспензии МСК в поврежденные ткани органа, может способствовать восстановлению структуры и функции поврежденной ткани.

Целью работы является исследование эффективности применения МСК для восстановления ткани МП кролика, поврежденной в результате инфицирования культурой *M. tuberculosis Erdman*.

Основные методы исследования: инфицирование лабораторных животных культурой *M. tuberculosis Erdman* с оценкой эффективности заражения, получение МСК, введение наночастиц в состав клеток с проведением последующей оценки эффективности их включения с помощью методов иммунофлуоресценции и конфокальной микроскопии, инъекция суспензии МСК в измененные (рубцовые) области МП кролика, оценка характера восстановления ткани МП путем проведения гистологического и иммуногистохимического анализа.

Было получено эффективное восстановление рубцово-измененной ткани МП после использования клеточной терапии. Используемый подход

для лечения последствий, вызванных туберкулезом, может стать альтернативой принятой сейчас реконструкции МП кишечными фрагментами, что позволит полностью или частично восстановить функции, поврежденных органов, а также имеет высокую социальную значимость, так как позволит повысить качество жизни пациентов и снизить инвалидизацию. Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФИ № 14-50-00068.

ENHANCED CRYOPRESERVATION OF MSCS IN MICROFLUIDIC BIOREACTOR BY REGULATED SHEAR FLOW

Arindam Bit¹, Akalabya Bissoyi¹, Bikesh Kumar Singh¹

1. Department of Biomedical Engineering, National Institute of Technology, Raipur, India.

arinbit.bme@nitrr.ac.in

Cell-matrix systems can be stored for long period of time by means of cryopreservation. Cell-matrix and cell-cell interaction has been found to be critical in a number of basic biological processes. Tissue structure maintenance, cell secretory activity, cellular migration, and cell-cell communication all exist because of the presence of cell interactions. This complex and co-ordinate interaction between cellular constituents, extracellular matrix and adjacent cells has been identified as significant contributors in the overall co-ordination of tissue. Prime objective of this investigation is to evaluate the effects of shear-stress and cell-substrate interaction in successful recovery of adherent human mesenchymal-stem-cells (hMSCs). A customized microfluidic bioreactor has been used for this purpose. We have measured the changes in focal-point-adhesion (FPAs) by changing induced shear stress inside the bioreactor. Finding indicates that with increase in shear stress, FPAs increases between substrate and MSCs. Further, experimental result shows that increase FPAs (4e-3 bar) enhances the cellular survivability of adherent MSCs. For the first time involvement of focal point interaction in the outcome of cryopreservation of MSCs has been clarified, and it proved a potentially new approach for modification of cryopreservation protocol by up regulating focal point of cells to defined improve clinical application.

Keywords: Cryopreservation, Focal point adhesion, Microfluidic bioreactor, Shear flow, Cell-matrix system, Tissue engineering

МИКРОФЛЮИДИКА КАК ОСНОВА ВОСПРОИЗВОДИМОГО ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Фадеева Н.П.^{1,2}

1. ООО «Компания Хеликон», Москва, Россия.
2. НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, Россия.
n. fadееva @helicon.ru

В настоящее время существует несколько путей перепрограммирования соматических клеток в плюрипотентные стволовые клетки. Одним из перспективных методов перепрограммирования является использование комбинаций генетического материала, кодирующего белковые репрессирующие факторы, рекомбинантных белков, микроРНК и низкомолекулярных биологически активных веществ для индукции превращения соматической клетки в стволовую клетку.

Определение уникального набора факторов, которые необходимы для перепрограммирования одного типа клеток в другой, представляет собой длительный и дорогостоящий процесс. Одной из главных проблем подобных экспериментов на сегодняшний день является воспроизводимость результатов. В ходе контрольных экспериментов исследователями были обнаружены невозпроизводимые клеточные линии в 122 из 150 проектов с опубликованными данными.

Технологии на основе микрофлюидики, позволяющие исследователям манипулировать нанолитровыми объемами жидкости с помощью систем каналов, делают возможным решение множества задач, требующих высокой точности и воспроизводимости, сводя многонедельные и многостадийные эксперименты по перепрограммированию клеток в единый простой автоматический протокол.

HUMANITY IN A DISH: KEY TECHNOLOGIES FOR DISEASE MODELLING WITH HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

Christoph Hofer¹, Rhonda A. Newman², Matthew R. Dallas², Soojung Shin², Michael A. Derr², Alex Hannay², Jennifer Crean³

1. Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France.
2. Thermo Fisher Scientific, Frederick, MD, USA.
3. Thermo Fisher Scientific, Grand Island, NY, USA.
christoph.hoefер@thermofisher.com

Pluripotent stem cells (PSCs) are powerful tools for developmental biology, regenerative medicine, and the study of debilitating human diseases. We have addressed challenges in the PSC workflow and I will discuss diverse recent improvements to building models for human diseases from efficient reprogramming, feeder-free expansion and robust differentiation to genomic modifications using gene editing methods. We have developed a simplified and standardized system to make midbrain floor plate cells and further matured to dopaminergic neurons. Furthermore we have developed integrated approaches for the generation of validated iPSC banks and created a feeder-free PSC culture system enabling translational & clinical research using cGMP manufactured reagents.

FIRST OUTCOME OF TISSUE-ENGINEERED TRANSPLANTATION Of BIOARTIFICIAL SCAFFOLD IN NON HUMAN PRIMATES

Macchiarini PJ¹, Orlov S.², Caralogli G.², Tenchurin T.Kh.³, Shepelev A.D.³, Chvalun S.³, Gilevich I.⁴, Naryzhnyi N.⁴, Porhanov V.⁴

1. Laboratory of Bioengineering and Regenerative Medicine (BioReM), Kazan Federal University, Kazan, Russia.
2. Research Institute of Medical Primatology Center, Russia. Laboratory of the Polymer materials, Research Center "Kurchatov Institute" Moscow, Russia.
3. Scientific Research Institution - S.V. Ochapovsky Regional Clinic Hospital № 1, Public Health Ministry, Krasnodar, Russia.

Currently, the only curative treatment for esophageal diseases like tumors, trauma or congenital abnormalities is surgical resection and reconstruction, usually using replacement tissue taken from the patients' stomach, colon or jejunum and associated with considerable morbidity and mortality. Tissue engineering represents a promising alternative, where 3-dimensional 'scaffolds' provide structural support and cues to allow tissue regeneration. One possible source of such scaffolds is organs taken from deceased donors and decellularized - removing material that might create an immunological response in the recipient. Such 'biological scaffolds' have shown potential in clinical transplants including the trachea, urinary bladders and esophageal mucosa. We previously demonstrated that in rats, decellularized esophageal grafts, when reseeded, can regenerate epithelial, neuronal, muscular and vascular components.

However, such biological scaffolds for tissue engineering of the esophagus, while in rely on organ donation, and the process of organ harvesting and decellularization is inherently complex and time-critical. Bioartificial materials would represent an excellent alternative to biological scaffolds because they could be readily and easily manufactured and tailored to patients' needs. Our RSF collaborators from the Kurchatov Institute in Moscow have manufactured a new electrospun material, polyamide-6 (fiber diameter range, 1.6-3.6 μm ; density, 7.1%, thickness, 0.77 mm) which may provide a suitable substrate for a bioartificial scaffold for oesophageal tissue engineering. This new polymer material displayed the best *in vitro* cyto-compatibility when evaluated blindly against other Food and Drug Administration (FDA, USA) approved biomaterials like polyethylene terephthalate (PET) or polyurethane (PU).

Given the promising success of the *in vitro* testing, the next stage is to test the biocompatibility and biomechanical suitability of polyamide-6 *in vivo*. Usually, the first *in vivo* tests are done in small animals like rodents.

Unfortunately, our previous experiences in rodents and large animals (pigs) has shown that, albeit feasible, the transplantation of the esophagus or other cervical organs in such animals is very challenging surgically, has a very complex post-operative course (rats) and larger (pigs) animals do not have the neck mobility and extensibility of humans to be suitable models for clinical translation. We therefore decided to use *Papio hamadryas* baboons as *in vivo* models in this study. The preliminary results (3 months) of this randomized and blinded study will be presented.

This work was funded by a Russian Science Foundation grant (No. 14-45-00018)

NANOPARTICLES AND STEM CELLS, A POWERFUL COMBINATION?

Wolfgang Parak¹

1. Fachbereich Physik, Philipps Universität Marburg, Marburg, Germany.
wolfgang.parak@physik.uni-marburg.de

In the last decade there has been significant advance in the synthesis of new nanomaterials [1, 2]. Nanomaterials have been for example suggested as delivery systems for pharmaceutical compounds [3]. One drawback hereby is, similar to conventional pharmaceutical formulations, the problem of targeted delivery, i.e. controlled biodistribution. Biodistribution of nanomaterials after systemic administration has been analyzed with different techniques [4], predominantly demonstrated unwanted accumulation in the liver. Controlled surface modifications of the nanomaterials may help to improve targeting [5]. On the other hand, stem cells are known for their homing capacity. In this way stem cells might be used as vehicle for targeted delivery of nanomaterials, which will be discussed.

References:

[1] W. J. Parak, "Complex Colloidal Assembly", *Science* 334, 1359-1360 (2011).

[2] W. J. Parak, "Controlled interaction of nanoparticles with cells DNA hybridization can control the exposure of cell-targeting receptors on nanoparticles", *Science* 351, 814-815 (2016).

[3] A. Ambrosone, V. Marchesano, S. Carregal-Romero, D. Intartaglia, W. J. Parak, C Tortiglione, "Control of Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Vivo via Light Responsive Capsules", *ACS Nano* 10, 4828-4834 (2016).

[4] W. G. Kreyling, A. M. Abdelmonem, Z. Ali, F. Alves, M. Geiser, N. Haberl, R. Hartmann, S. Hirn, K. Kantner, D. Jimenez de Aberasturi, G. Khadem-Saba, J.-M. Montenegro, J. Rejman, T. Rojo, I. Ruiz de Larramendi, R. Ufartes, A. Wenk, W. J. Parak, "In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles", *Nature Nanotechnology* 10, 619-623 (2015).

[5] M. Colombo, L. Fiandra, G. Alessio, S. Mazzucchelli, M. Nebuloni, C De Palma, K. Kantner, B. Pelaz, F. Corsi, W. J. Parak, D. Prosperi, "Dependence of in Vivo Tumor Homing, Localization and Therapeutic Effect of Colloidal Nanoparticles on the Number of Attached Antibodies", *Nature Communications*, in minor revision.

BIOLOGICAL ESOPHAGEAL SCAFFOLDS: QUO VADIS?

Jungebluth Ph.¹

1. Heidelberg, Germany.

A biotissue-engineered esophageal scaffold could be a useful therapeutic tool for congenital and acquired disorders.

We have successfully developed a small animal model of tissue engineered esophagus using decellularized tissue, seeded with autologous stem cells and cultured in a bioreactor. The created esophageal graft mimics most relevant characteristics of the natural organ, such as native architecture, mechanical properties and bioactive aspects. Besides, the graft is non-immunogenic and hence can be utilized without using immunosuppressive medication.

The engineered esophageal graft could be orthotopically implanted and demonstrated successful intermediate outcomes, including a survival period of 14 days, graft's patency, as well as functional properties and primitive cellular organization (functional epithelium, muscle fibres, nerves and vasculature) of the native esophageal tissue.

Despite these promising data we believe that our small animal model does not reflect the clinical conditions and various clinical aspect are not considered.

In order to make the next step forward in esophageal tissue engineering and get closer to prospective clinical application, the transfer of the concept into large animal models, such as non-human primates is pivotal.

ВОЗМОЖНОСТЬ ЗАСЕЛЕНИЯ КЛЕТОЧНОГО МАТЕРИАЛА В МАТРИКСЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДАМИ ЭЛЕКТРОСПИННИНГА И АЭРОДИНАМИЧЕСКОГО ФОРМОВАНИЯ В ТУРБУЛЕНТНОМ ГАЗОВОМ ПОТОКЕ

Афанасьев С.А.¹, Нащекина Ю.А.², Никонов П.О.², Роговская Ю.В.¹, Ребенкова М.А.¹, Больбасов Е.Н.³, Твердохлебов С.И.³

1. НИИ кардиологии Томский НИМЦ, Томск, Россия.
2. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
3. Национальный исследовательский Томский политехнический университет, Томск, Россия.
Tursky@cardio-tomsk.ru

Методами электроспиннинга и аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке (АЭРДФ) можно получить синтетические структуры, пространственные строения которых во многом подобны межклеточным матриксам.

Цель работы. Оценить пригодность матриксов, сформированных методами электроспиннинга и АЭРДФ, для заселения клеточным материалом.

Использованы два типа пористых матрикса диаметром 20 мм и толщиной 150 мкм из полимолочной кислоты. Один из них (№ 1) получен методом электроспиннинга на установке «NANON-NF 01» (Япония), а другой (№ 2) - методом АЭРДФ на установке собственной конструкции. Структуру матриксов исследовали на электронном микроскопе. Матрикс заселяли методом динамического заселения, прокачивая 15 мл суспензии, содержащей $0,6 \times 10^5$ кл/мл стромальных клеток костного мозга кролика. Затем матриксы переносили в питательную среду и на 3 суток помещали в CO_2 инкубатор при температуре 37 °С. Клетки выявляли, используя ядерный краситель DAPI, на микроскопе Axio Imager M2 с программой ZEN 2 pro (функция Z-stek).

Используемые матриксы имели разную структуру. Матрикс № 1 сформирован отдельными волокнами цилиндрической формы. Матрикс № 2 имеет более сложную структуру представленную жгутами, глобулами и микроволокнами, их средний диаметр был более чем на 300% меньше чем в матриксе №1. В матриксах №1 и №2 среднее количество выявленных клеток при обработке их 2D изображении составило -56,3 и 81,4, соответственно, а в 3D изображениях -120 и 215, соответственно.

Таким образом, матриксы из полимолочной кислоты, сформированные методом АЭРДФ, лучше заселяются клеточным материалом, что, видимо, обусловлено их более оптимальной для этих целей пространственной организацией.

Поддержано: Российским научным фондом (проект № 16-13-10239).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ПОПУЛЯЦИИ КЛЕТОК МИКРОГЛИИ ПРИ ГЕННО-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА КРЫС

Ахметзянова Э. Р.¹, Журавлева М. Н., Галиева Л. Р., Мухамедшина Я. О.

1. OpenLab Генные и клеточные технологии Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Российская Федерация. *elyaelya18@gmail.com*

Одним из подходов к терапии травм спинного мозга (ТСМ) и поддержанию регенерации нервных волокон является клеточная терапия. В последнее время интерес многих исследователей направлен на клетки микроглии. При повреждении спинного мозга клетки микроглии вырабатывают нейротрофины и факторы роста, а также активируют глию в области рубца, которая впоследствии продуцирует трофический градиент. Считается, что именно эти процессы способствуют прорастанию аксонов в поврежденной центральной нервной системе.

В качестве модели была выбрана дозированная контузионная травма спинного мозга крысы на уровне Th8. Сразу после нанесения повреждения опытным крысам вводили клетки микроглии, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусным вектором с геном глиального нейротрофического фактора (МГ-Ad5-GDNF). В качестве контрольных групп были исследованы: (1) ТСМ с трансплантацией клеток микроглии, трансдуцированных аденовирусом с геном усиленного зеленого флуоресцентного белка (МГ-Ad5-EGFP) и (2) ТСМ без введения клеток.

В ткани спинного мозга на 30 сутки после операции в экспериментальных группах в белом и сером веществе были обнаружены клетки, экспрессирующие маркер микроглии Iba1. Результаты анализа интенсивности флуоресценции белка Iba1 показали, что на расстоянии 0.5 см ростральнее от эпицентра травмы, в опытной группе (МГ-Ad5-GDNF) в зонах кортикоспинального тракта, вентральных рогов и вентральных канатиков данный показатель достоверно выше соответствующих в других экспериментальных группах. На расстоянии 0.5 см каудальнее от эпицентра травмы в белом и сером веществе исследуемый показатель был достоверно выше в группах с трансплантацией клеток по сравнению с группой без трансплантации.

Таким образом, трансдукция клеток микроглии аденовирусным вектором, кодирующим ген GDNF, способствует выживанию клеток-носителей в области травмы спинного мозга, что установлено по критерию увеличения интенсивности флуоресценции белка Iba1.

Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-4020.2015.7).

АНАЛИЗ ЭНДОЦИТОЗА РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Баранова Д.Н., Ч Салова А.В.¹, Бородкина А.В.¹, Корнилова Е.С.^{1,2},
Харченко М.В.¹

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
2. СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия.
3. СПбПУ, Санкт-Петербург, Россия.
mariannakharchenko@gmail.com

ЭФР воздействует на клетки посредством формирования комплекса со специфическим трансмембранным рецептором-тирозинкиназой (РЭФР) на плазматической мембране. Кроме активации сигнальных каскадов, взаимодействие ЭФР с РЭФР стимулирует эндоцитоз лиганд-рецепторного комплекса. Механизмы эндоцитоза изучаются на различных модельных объектах более сорока лет, однако на стволовых клетках такие исследования почти не проводились, несмотря на то, что ростовые факторы участвуют в регуляции программ самообновления и дифференцировки стволовых клеток.

В данной работе был проведен анализ эндоцитоза РЭФР в эндометриальных мезенхимных стволовых клетках человека (эмСК), МСК из жировой ткани и в immortalized клетках эпителиального происхождения (HeLa) биохимически и методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии. Эндоцитоз стимулировали добавлением ЭФР. Показано, что количества РЭФР в эмСК и в клетках HeLa схожи. При этом РЭФР в нестимулированных клетках HeLa распределён равномерно по плазматической мембране, тогда как в эмСК локализован в основном на тяжах, напоминающих стресс-фибриллы. После стимуляции эндоцитоза ЭФР в МСК эти структуры не исчезают, кроме того, появляются многочисленные мелкие везикулы, содержащие комплексы РЭФР-ЭФР. ЭФР в концентрации 100 нг/мл стимулирует формирование большего числа везикул, чем при низкой (12 нг/мл) концентрации. В отличие от клеток HeLa, даже через 60 мин после стимуляции эндоцитоза РЭФР-содержащие везикулы остаются мелкими и не перемещаются в околядерную область. Методом иммуноблоттинга показано, что после добавления ЭФР происходит фосфорилирование как РЭФР, так и ERK1/2 во всех исследованных линиях. Однако, если в клетках HeLa уже через 20-40 мин фосфорилированные ERK1/2 и РЭФР не детектируются, то в эмСК эти белки активированы и через 60 мин после стимуляции эндоцитоза. При этом в эмСК через 60 мин после стимуляции эндоцитоза наблюдается уменьшение количеств ERK1/2 и РЭФР в 2 раза, что не характерно для клеток HeLa.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00068) и при финансовой поддержке ФАНО с использованием оборудования РЦ РМИКТСПбГУ.

ДИНАМИКА ЭКСПРЕССИИ PD-1 НА Т-ЛИМФОЦИТАХ В ХОДЕ ИММУНОТЕРАПИИ АКТИВИРОВАННЫМИ Т-КЛЕТКАМ И У ПАЦИЕНТОВ С АТОПИЧЕСКИМ ДЕРМАТИТОМ

Блинова Е.А.¹, Пашкина Е.А.¹, Леонова М.И.², Непомнящих В.М.², Демина Д.В.², Козлов В.А.¹

1. НИИФКИ, Новосибирск, Россия.
2. Клиника иммунопатологии НИИФКИ, Новосибирск, Россия.
blinovaelena-85@yandex.ru

Предрасположенность каллергическим заболеваниям в последнее время связывают с дисфункциями регуляторных клеток. Супрессорная функция Трег обеспечивается продукцией ИЛ-10 и TGF- β , а также экспрессией ряда поверхностных рецепторов, включая лиганд к PD-1. В образовании Т-регуляторных клеток также задействована ось PD-1/PD-L1. Молекула PD-1 появляется на поверхности Т-клетки после активации, в покоящихся клетках ее экспрессия отсутствует. Индукция антиэрготопического ответа в процессе иммунотерапии аутологичными активированными клетками позволяет элиминировать активированные Т-клетки вне зависимости от их антигенной специфичности. Целью данного исследования было определение экспрессии PD-1 в различных субпопуляциях Т-клеток у пациентов с atopическим дерматитом в динамике клеточной иммунотерапии.

В процессе иммунотерапии пациентам подкожно вводили активированные α -CD3 антителами+IL-2 Т-клетки (30×10^6) по схеме: 1 инъекция/неделя - №4, остальные 6-1 инъекция/мес. Эффективность терапии определялась как уменьшение клинических симптомов, в 80% случаев уменьшение составляло порядка 50%. Фенотипирование клеток осуществляли с помощью моноклональных антител методом проточной цитометрии.

До иммунотерапии пациенты с АД характеризовались повышенной по сравнению с донорами экспрессией молекулы PD-1 на CD4⁺ лимфоцитах, что свидетельствует о циркуляции в периферической крови активированных клеток. На 10 введении популяция CD4⁺ и CD8⁺ клеток имела тенденцию к снижению экспрессии PD-1 по сравнению с уровнем до вакцинации. При этом наблюдалось достоверное снижение экспрессии PD-1 на CD4⁺, CD8⁺ Т-клетках, экспрессирующих CD25, и на CD4⁺25^{high} регуляторных клетках до уровня донорских значений. Мы предполагаем, что наблюдаемые изменения свидетельствуют, возможно, о снижении числа участвующих в аллергической реакции активированных Т-клеток в результате антиэрготопического ответа. Есть данные, что PD-1 может не-

гативно влиять на регуляцию своей функции: сигнал от PD-1 увеличивает экспрессию PTEN, что приводит к снижению экспрессии PD-L1 и негативно сказывается на образовании и/или функциях Т-регуляторных клеток. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-34-60167 мол_а_дк.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИМПЛАНТАЦИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Божокин М.С.¹, Нащекина Ю.А.², Божкова С.А.¹, Нетелько Г.И.¹,
Наконечный Д.Г.¹, Румакин В.П.¹

1. ФГБУ РНИИТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия.

2. ФГБУ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

writeback@mail.ru

Цель исследования: сравнительная оценка перифокальных изменений при имплантации полилактидной мембраны в область поверхностного дефекта хряща коленного сустава крысы.

Материалы и методы: Половозрелым беспородным крысам (n=24) формировали дефект хряща коленного сустава диаметром 1,0 мм и глубиной 0,5 мм. Животным опытной группы (ОГ) (n=12) полилактидную мембрану (d=1 мм, h=0,3 мм, размер пор 20 мкм) фиксировали фибриновым клеем в области дефекта. В контрольной группе (КГ) (n=12) закрытие дефекта не выполняли. Изменения оценивали гистологически и с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на 30 и 90 сут.

Результаты: Инфекционно-воспалительных процессов в области операции не выявлено. По данным СЭМ на 30 сут. в КГ отмечено формирование краевых трещин, увеличение дефекта (d=1,2 мм) и заполнение его пористым содержимым, гистологически соответствующим волокнистой ткани, кроме того микроскопически установлено истончение дна дефекта хряща. В ОГ по данным СЭМ мембрана явно не визуализировалась, дефект (d=1,2 мм) неправильной формы с нечёткими краями, покрыт пористой плотной, вновь образованной тканью, поверхностная структура которой отличалась от интактного и волокнистого хряща, сформированного в КГ. Гистологически дно дефекта покрыто волокнистой тканью, в которой определялась мембрана без клеточного содержимого внутри. К 90 сут. в КГ по данным СЭМ дефект увеличился (d=2.5), имел четкие края с множественными краевыми трещинами, идущими в неповреждённый гиалиновый хрящ, изнутри заполнен пористым новообразованным регенератом, гистологически соответствующим волокнистому хрящу. Толщина субхондральной пластины уменьшена. В ОГ по данным СЭМ дефект (d=1,5 мм) покрыт новообразованным регенератом с неоднородной структурой. Гистологически на поверхности дефекта определялись остатки частично погружённой в волокнистый хрящ мембраны неправильной формы (0,4 мм) с клеточным содержимым, края дефекта сформированы гипертрофированным гиалиновым хрящом.

Выводы: Исследуемая полилактидная мембрана в течение 90 сут. биодеградирует примерно на 60%, ее имплантация в область дефекта способствует заполнению дефекта волокнистым и гипертрофированным гиалиновым хрящом, что, по-видимому, тормозит развитие дегенеративных процессов.

КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ И АУТОФАГИИ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Бородкина А.В.¹, Дерябин П.И.¹, Грюкова А.А.¹, Шатрова А.Н.¹, Бурова Е.Б.¹

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
borodkina618@gmail.com

Введение. Хорошо известно, что процессы самообновления, пролиферации и дифференцировки стволовых клеток требуют участия внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$). Однако до сих пор остается слабо изученной роль кальция в ответах стволовых клеток на стрессовые воздействия. Ранее мы показали, что эндометриальные стволовые клетки человека (эмСК) подвергаются преждевременному старению в условиях сублетального окислительного стресса. Цель настоящей работы: исследование роли $[Ca^{2+}]_i$ в процессе преждевременного старения эмСК, индуцированном перекисью водорода.

Методы. В работе были использованы следующие методы: оценка уровня внутриклеточного кальция с помощью конфокальной микроскопии, проточная цитофлуориметрия, иммуноблот, SA- β -Gal окрашивание, метод оценки эффективности образования колоний, определение уровня внутриклеточных активных форм кислорода.

Результаты. Сублетальный окислительный стресс ($200 \mu M H_2O_2$, 1 ч) приводит к быстрому подъему уровня $[Ca^{2+}]_i$ в эмСК. В экспериментах по связыванию экстраклеточного кальция выявлен преимущественный вклад внутриклеточных депо в наблюдаемое увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Использование таких соединений как U73122, UTP, TG и 2APB позволило установить, что рост уровня $[Ca^{2+}]_i$ в эмСК в ответ на окислительный стресс опосредован PLC/IP3/IP3R сигнальным путем. Впервые было показано, что (1) в эндометриальных стволовых клетках повышение уровня кальция опосредует прогрессию преждевременного старения в ответ на сублетальный окислительный стресс, (2) хелатирование кальция стимулирует аутофагию и позволяет предотвратить развитие старения.

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Бриллиант А.А.¹, Засадкевич Ю.М.¹, Сазонов С.В.¹

1. ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия.
alex_brilliant@mail.ru

Изучение белка Ki67 дает нам представление о пролиферативной активности изучаемой ткани. Этот маркер входит в панель для определения иммуногистохимического подтипа опухоли, согласно которому назначается терапия для исследуемого случая. Однако при определении иммуногистохимических подтипов не учитываются особенности опухолевых стволовых клеток в ткани карциномы, рецепторный статус и пролиферативная активность которых может отличаться от опухолевого пула. Опухолевые стволовые клетки обладают набором генетических и функциональных изменений, позволяющих им быть устойчивыми к действию лекарственных препаратов.

Целью данного исследования является сравнение состояния пролиферативных процессов в клетках опухолевого пула и опухолевых стволовых клетках инфильтративных карцином молочной железы.

Материалы и методы: Исследован материал 112 случаев карцином молочной железы. Для определения стволовых клеток в опухолевой популяции иммуногистохимическим методом исследовали наличие экспрессии белка ALDH1 в клетках указанных карцином, а также уровень пролиферативной активности, оцениваемый по ядерному индексу пролиферации клеток опухоли - Ki67. Все иммуногистохимические реакции проводили с использованием автостейнера "Ventana", USA.

В ходе исследования были отобраны 9 случаев с высокой экспрессией ALDH1 (>10% окрашенных клеток опухоли). Подсчет индекса пролиферативной активности осуществлялся в 1000 клетках каждого случая (500 клеток опухоли без экспрессии ALDH, 500 стволовых опухолевых клеток).

Обнаружено, что средний уровень пролиферативной активности всех исследованных случаев Ki67 =33.7%. Индекс пролиферации опухолевого пула в случаях с высоким содержанием стволовых опухолевых клеток достоверно не отличается от пролиферативной активности всех случаев и составляет 34,3%. Однако пролиферативная активность опухолевых стволовых клеток в таких случаях достоверно выше на 7% ($p<0.05$) и составляет 41,6%. При этом в некоторых случаях пролиферация стволовых опухолевых клеток в 1,5-2 раза выше основного опухолевого пула.

Таким образом, при выявлении в опухоли более 10% стволовых опухолевых клеток необходимо учитывать, что их пролиферативная активность значительно выше основного опухолевого пула.

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ПУЛЬПЫ ЗУБА

Бухарова Т.Б.¹, Леонов Г.Е.¹, Галицына Е.В.¹, Васильев А.В.^{1,2}, Махнач О.В.¹, Гольдштейн Д.В.¹

1. ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия.
2. ФГБУ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России, Москва, Россия.
Bukharova-rmt@yandex.ru

Для эффективного применения мультипотентных стромальных клеток из пульпы выпавших молочных зубов (SHED-клеток) с целью стимулирования регенерации костной ткани необходимы данные о влиянии криоконсервации на способность клеток дифференцироваться в остеогенном направлении.

Культуры SHED-клеток получали из зубов детей 7-9 лет (n= 4) после подписания родителями информированного согласия. Из выпавших зубов извлекали пульпу и дезагрегировали ткани механически и путем инкубации в растворе коллагеназы I типа (2 мг/мл). Клеточную суспензию помещали в чашки Петри и культивировали в ростовой среде: DMEM, 10% ЭТС, 100 мг/л амикацина. Остеогенную дифференцировку проводили путем инкубации в остеогенной среде: DMEM, 10% ЭТС, 100 мг/л амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ β-глицерофосфата натрия, 100 нМ дексаметазона или 10 нМ 1α, 25-дигидроксивитамина D3 (кальцитриола) в течение 14 суток. С помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени изучали экспрессию генов ключевых остеогенных маркеров. Минерализацию внеклеточного матрикса выявляли путем окрашивания ализариновым красным. Для криоконсервации клеточной суспензии добавляли криозащитный раствор: 10% ДМСО, 90% ЭТС и охлаждали до -196°C.

Инкубация SHED-клеток в остеогенной среде с витамином D3 приводила к повышению уровня экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки: остеокальцина, щелочной фосфатазы, BMP-2 и RunX2, синтезу и минерализации внеклеточного матрикса до и после криоконсервации. В присутствии дексаметазона повышения экспрессии большинства исследуемых генов не наблюдалось, а также не происходило минерализации матрикса. Показано, что витамин D3 является эффективным индуктором остеогенной дифференцировки SHED-клеток, тогда как дексаметазон практически не влияет на дифференцировку в остеогенном направлении. Сохранение остеогенного потенциала после длительной криоконсервации может служить основанием для банкирования SHED-клеток с целью дальнейших ауто- или аллотрансплантаций.

CLINICAL-GRADE MSC-ASSOCIATED HEMATOPOIETIC CD34 CELLS EXPANSION

Vasina E.УЛ¹, Kostjunina V.S.¹, Goncharova N.V.¹, Petyovka N.V.¹

1. The Republic Research & Production Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus.

vasina@blood.by

Transplantation of *ex vivo* expanded human umbilical cord blood cells enhances the neutrophil engraftment after myelosuppressive therapy, but only partially enhances platelet engraftment. Hematopoietic cells co-cultivation with bone marrow microenvironment stromal component is one of expansion techniques. However, using this approach adherent cells usually are not transplanted. We hypothesized that posttransplantational megakaryocytopoiesis would be improved by transplanting mesenchymal stromal cells (MSC) -associated CD34⁺ cells that were short-time expanded *ex vivo*.

We have devised an approach to cultivate cord blood or peripheral blood CD34⁺ cells in serum-free and xenogen-free culture conditions. The six-day co-culture of CD34⁺ cells in direct cellular contact with human bone marrow MSC and thrombopoietin/Kit-ligand/Flt3-ligand resulted in a 30 ± 11 and 9 ± 4 - fold expansion of cord blood and peripheral blood CD34⁺ cells respectively. 23 ± 7% of cord blood hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC) and 37 ± 8% of peripheral blood HSPC were associated with stromal cells on 6th day of co-culture. The adherent HSPC fraction contained a higher proportion of CD34⁺Lin⁻ cells, multipotential colony-forming cells (CFU-GEMM) and megakaryocyte colony-forming cells (CFU-Meg). The percentage of early CD34⁺CD41⁺ megakaryocytic cells showed a significant increase from 3,5±1,3% to 13,2±0,5% for peripheral blood HSPC and from 1,9±1,1% to 4,3±3,3% for cord blood HSPC, leading to 50-100-fold expansion of CD34⁺CD41⁺ cells. We identified 78±7% of megakaryocytic progenitors adhered to MSC-layer. Both hematopoietic and stromal cells demonstrate low apoptotic rate (1-3%) after co-culturing.

Our results underscore the importance of using bone marrow niche elements (like MSC) in CD34⁺CD41⁺ cells expansion. We suppose transplantation of MSC-associated HSPC together with co-cultivated recipient's bone marrow MSC and non-adherent hematopoietic cells can enhance platelet engraftment after transplantation.

СЫВОРОТКА ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА: ЭФФЕКТИВНАЯ ЗАМЕНА ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ТЕЛЯЧЬЕЙ СЫВОРОТКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Волгина Н.Е.¹, Романов Ю.А.^{2,3}, Балашова Е.Е.³, Кабаева Н.В.², Дугина Т.Н.³

1. ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова Минздрава РФ», Москва, Россия.

2. ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс Минздрава РФ», Москва, Россия.

3. Банк пуповинной крови «КриоЦентр», Москва, Россия.

volginadi@gmail.com

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) находят все более широкое применение в различных областях регенеративной медицины. Обычно, в качестве одного из компонентов среды для культивирования МСК используется эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС). Это повышает риск алло-иммунизации пациента и возникновения нежелательных осложнений. В данной работе были отработаны условия культивирования МСК в присутствии пулированной сыворотки пуповинной крови (СПК) человека.

Изначально, МСК культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10% ЭТС. Затем среду культивирования заменяли на свежую, содержащую 1 - 2,5 - 5 - 7,5 - 10% СПК или 10% ЭТС (контроль). Пролиферативную активность оценивали путем построения кривых роста, измерения среднего времени удвоения и кумулятивного числа удвоений на протяжении 6-7 пассажей. Экспрессию CD90, CD105, CD73, CD13, CD29, CD44, CD54, CD71, CD117, CD146, HLA-ABC, HLA-DR оценивали с помощью проточной цитометрии; способность дифференцироваться в адипо- и остеогенном направлении в селективных условиях по выявлению жировых включений и экспрессии щелочной фосфатазы, соответственно.

Установлено, что в диапазоне концентраций от 2.5 до 10% СПК эффективно поддерживает пролиферацию МСК. По сравнению с контрольными культурами, наиболее близкие результаты были получены при 5% СПК. Существенных различий в уровне экспрессии отдельных маркеров и способности МСК к разнонаправленной дифференцировке выявлено не было.

Таким образом, СПК может рассматриваться как эффективная замена ЭТС при получении клеток, свободных от агентов животного происхождения, и производства клеточных продуктов медицинского назначения.

Работа выполнена при поддержке РФФ (грант № 14-25-00179).

ИЗУЧЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУРЫ ЖИРОВЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ ВЛИЯНИЯ ЦИСПЛАТИНА

Гилазиева З.Е.¹, Архипова С.С.¹, Тазетдинова Л.Г.¹, Соловьева В.В.¹

1. Институт Фундаментальной Медицины и Биологии, Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия.
gilazievazarema@mail.ru

Несмотря на современные достижения медицины, количество онкологических заболеваний возрастает. Поэтому поиск новых методов терапии представляется чрезвычайно актуальным. Одним из таких методов может являться доставка цисплатина мезенхимальными стромальными клетками жировой ткани человека. Однако действие этого препарата на биологические свойства мезенхимальных стромальных клеток в значительной степени не описаны.

В данной работе с помощью просвечивающей электронной микроскопии была исследована ультраструктура мезенхимальных стромальных жировых клеток человека после влияния цисплатина разной концентрации: 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10µg/ml. В качестве контроля изучались нативные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека.

Полученные нами данные показывают, что 48 часовая инкубация клеток с цисплатином в концентрации 2.5 µg/ml не привела к существенным изменениям в ультраструктуре клеток. Ультраструктура мезенхимальных стромальных жировых клеток человека, инкубированных с цисплатином с концентрацией 5 µg/ml, показала увеличение разветвленности и длины псевдоподий по сравнению с нативными клетками. Концентрация цисплатина 10 µg/ml привела к значительным ультраструктурным изменениям клеток по сравнению с контролем. Проведенное исследование показывает, что концентрации цисплатина 2.5 µg/ml и 5 µg/ml могут использоваться для дальнейших исследований при разработке методов терапии онкологических заболеваний с использованием мезенхимальных стромальных клеток.

АНАЛИЗ НЕЙРОГЕНЕЗА У КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОГАМ

Глазова М.В.¹, Баришевская О.Н.¹, Наслузова Е.В.¹, Куликов А.В.¹,
Зосен Д.В.¹, Черниговская Е.В.¹

1. ИЭФБ РАН, Санкт-Петербург, Россия.
mglazova@iephb.ru

Хорошо известно, что эпилепсия у людей или стимулированные судорожные припадки у животных приводят с одной стороны к развитию aberrантного нейрогенеза в гиппокампе, а с другой к дисперсии гранулярного слоя зубчатой извилины. Однако до сих пор остается неизученным вопрос о состоянии нейрогенеза при генетически обусловленной эпилепсии. На сегодняшний день выявлен ряд генов, мутации в которых сопряжены с эпилепсией, при этом некоторые из этих генов также участвуют в регуляции нейрогенеза.

Нами была выдвинута гипотеза о том, что в основе развития наследственной эпилепсии и её нейродегенеративных последствий могут лежать нарушения процессов нейрогенеза. В нашей работе мы оценили уровень пролиферации нейрональных стволовых клеток (НСК) гиппокампа у крыс линии Крушинского-Молодкиной (КМ), генетически предрасположенных к аудиогенной эпилепсии и являющихся моделью генетической эпилепсии человека. Крысы линии КМ, выведенные на основе линии Вистар, проявляют стабильную судорожную активность, вызванную звуковой стимуляцией. Первые проявления эпилептиформной активности у крыс КМ возникают после достижения 2,5 месячного возраста и полностью формируются к 3 месяцам.

Результаты показали, что по сравнению с крысами линии Вистар у двухмесячных «наивных» крыс КМ значительно больше BrdU-позитивных клеток в зубчатой извилине, что свидетельствует об повышенном уровне нейрогенеза. Мы также показали, что аудиогенный киндлинг приводит к значительному снижению не только общего количества нейронов, но и числа пролиферирующих клеток в зубчатой извилине. При этом ингибирование p53 введением селективного блокатора Pifithrin-a восстанавливало популяцию пролиферирующих клеток. Эти данные свидетельствуют о том, что аудиогенный киндлинг приводит к развитию p53-зависимого апоптоза НСК.

Таким образом мы показали, что у крыс КМ повышенная пролиферация НСК на ранних сроках постнатального онтогенеза может являться причиной развития aberrантного нейрогенеза, а также развивающаяся

дисперсия гранулярного слоя зубчатой извилины, вызванная судорогами, вероятно связана с гибелью НСК р53-зависимым апоптозом.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (16-04-00777, 16-04-00681).

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ФИБРОИНОВЫХ МИКРОНОСИТЕЛЯХ

Гончаренко А.В.¹, Котлярова М.С.¹, Семенова М.Л.¹, Храмова Ю.В.¹,
Паршина Е.А.¹, Мойсенович М.М.¹

1. МГУ имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия.

pylaevanna@gmail.com

Использование стволовых клеток для восстановления поврежденных тканей является интенсивно развивающимся направлением регенеративной медицины. Существует проблема плохой приживаемости клеток при снятии их с культуральной подложки и введении в пораженную область. Видимо, это связано с повреждением клеток при энзиматической обработке и чувствительности клеток к нарушению межклеточных контактов. Решением проблемы является введение клеток на биоразлагаемых микроносителях. В данной работе предлагается новый тип микроносителей на основе фиброина шелка (ФМ), обладающий сложной топографией поверхности, обеспечивающий объемную адгезию клеток. Исследована способность нового типа микроносителей поддерживать адгезию, пролиферацию и остеогенную дифференцировку мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (ММСК).

Из костного мозга мыши выделены ММСК с использованием стандартного протокола выделения. Стволовая природа ММСК подтверждена анализом экспрессии генов CD73, CD90, CD105, CD45. ММСК нанесены на минерализованные и не минерализованные ФМ в соотношении 50 тыс. клеток на 50 мкл суспензии, через сутки культивирования микроносители помещены в остеогенную среду и среду без индукторов остеогенеза. Пролиферация клеток на поверхности микроносителей оценивалась с помощью МТТ теста, остеогенная активность оценивалась по изменению уровня щелочной фосфатазы (ЩФ).

Проведенное исследование показало пролиферацию ММСК на поверхности всех типов ФМ, повышение уровня ЩФ и отложение кальция в остеогенных условиях, что указывает на остеогенную дифференцировку клеток на поверхности ФМ. Результаты исследования демонстрируют пригодность ФМ для культивирования и направленной дифференцировки ММСК и возможность использования ФМ для доставки клеток в область повреждения. Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №15-29-04903.

СОХРАНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОСТИ ПРИ 3D КУЛЬТИВИРОВАНИИ КЛЕТОК-ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ

Горкун А.А.¹, Кошелева Н.В.^{1,2}, Зурина И.Н.¹, Сабурин И.Н.^{1,3}

1. ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия.
 2. Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия.
 3. ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования Минздрава РФ, Москва, Россия.
- stgork@gmail.com*

Нервный гребень (НГ) представляет собой уникальную популяцию клеток переходного эпителио-мезенхимного фенотипа, которые активно мигрируют в различные ткани в процессе эмбриогенеза. Из клеток нервного гребня формируются ганглии нервной системы, астроциты, микроглия, олигодендроциты, хромоаффинные клетки надпочечников, одонтобласты, гладкомышечные клетки и перициты. В том числе, из пула клеток НГ возникает значительное число меланоцитов как покровных тканей, так и внутренних органов. Проводимое нами исследование популяций клеток, происходящих из нервного гребня, таких как меланоциты, в условиях 3D культивирования позволит изучить особенности данных клеток и разработать методики применения их в клинике для терапии различных заболеваний кожи. Темой данного исследования стало получение и характеристика сфероидов из меланоцитов кожи человека.

Исследование проводили на первичной культуре меланоцитов кожи человека (104-05N, CELLApplications) в стандартных условиях инкубирования (+37°C, 5%CO₂). Клетки культивировали в монослое в полной ростовой среде, адаптированной для меланоцитов (135-500, CELLApplications), до 3 пассажа. Далее клетки помещали на агарозные планшеты с микролунками (Microtissue, США) в посевной плотности 250 тыс.кп./мл. Анализ полученных сфероидов производили с помощью фотометрии, иммуноцитохимии и ПЦР в реальном времени.

Первичная культура была представлена клетками вытянутой формы, имеющими от двух до четырех отростков, пролиферировали с индексом пролиферации не более 1,5 и активно синтезировали меланин. При переводе культуры в 3D условия культивирования на агарозные планшеты меланоциты агрегировали друг с другом и формировали компактные сфероиды. При этом в клетках поддерживался синтез меланина. С помощью иммуноцитохимии было установлено, что в сфероидах экспрессировались тканеспецифичные маркеры: grp100, MITF и Sox10. Методом ПЦР в реальном времени была выявлена экспрессия характерных генов:

фермента меланогенеза тирозиназы и основного рецептора, регулирующего синтез меланина, MCR1.

Таким образом, в данном исследовании было показано, что производные нервного гребня способны формировать тканеподобные структуры *in vitro* с сохранением функциональности, характерной для данного типа клеток.

РАЗРАБОТКА ТЕРМОТРОПНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

Григорьев Т.Е.¹, Загоскин Ю.Д., Васильев А.В.^{2,3}, Бухарова Т.Б.³, Леонов Г.Е.^{2,3}, Гольдштейн Д.В.^{2,3}, Кулаков А.А.²

1. НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.
 2. ФГБУ «ЦНИИСиЧЛХ» Минздрава России, Москва, Россия.
 3. ФГБНУ «МГНЦ», Москва, Россия.
- timgrigo@yandex.ru*

Перспективным направлением для проектирования костно-пластических материалов является разработка биосовместимых гидрогелей на основе хитозана, способных отверждаться при температуре внутренней среды организма человека, с микропористым наполнителем для врастания сосудов и индукторами остеогенеза. Цель исследования - установить влияние молекулярной массы хитозана и степени его деацетилирования, определяющей количество заряженных групп, способных к образованию физических сшивок, на параметры гелеобразования системы и изучить цитосовместимость полученных гелей.

Для получения гидрогелей хитозан стерилизовали, растворяли в 0,1 М уксусной кислоте и добавляли водный раствор β-глицерофосфата при температуре 4°C. Конечная концентрация хитозана в растворе составляла 1,5%, β-глицерофосфата - 20%. Нагревание растворов до 37- 40°C приводило к образованию гидрогеля, сшивками которого являются ионные пары протонированных аминогрупп хитозана и фосфатных групп глицерофосфата. Кинетику гелеобразования исследовали на ротационном реометре. Для оценки цитотоксичности получали водную вытяжку из гелей и проводили МТТ-тест на культурах мультипотентных стромальных клеток (МСК) человека.

Молекулярные характеристики хитозана оказывают значительное влияние на кинетику гелеобразования системы и на физико-механические свойства получаемых гидрогелей. Было показано, что увеличение степени деацетилирования хитозана в пределах 65-85% приводит к снижению температуры гелеобразования, а увеличение молекулярной массы - к росту модуля упругости гидрогеля. Показано отсутствие цитотоксического действия полученных гелей на культуры МСК после 7 суток инкубации. Результаты позволяют использовать гидрогели на основе хитозана для разработки термотропного костно-пластического материала для применения в регенеративной медицине.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00298).

АВТОМАТИЗИРОВАННЫЙ МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ МИКРОПРЕПАРАТОВ ПРИ СОЗДАНИИ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

Гуменюк И.С.¹, Сотниченко А.С.¹, Гуменюк С.Е.¹, Куевда Е.В.¹, Гилевич И.В.¹, Накохов Р.З.¹, Губарева Е.А.¹

1. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия.
meklon@gmail.com

В связи с развитием тканевой инженерии большое значение придается качеству децеллюляризованных каркасов. Оптимальный протокол децеллюляризации детергент-энзиматическим методом должен обеспечивать сохранность внеклеточного матрикса (ВКМ). Для решения этой задачи была разработана программа «DAB analyzer», используемая как экспресс метод оценки содержания белков ВКМ при анализе микрофотографий образцов после гистохимического окрашивания. Исходные коды программы опубликованы под свободной GPL 3.0 лицензией (https://github.com/meklon/DAB_analyzer).

Материалы и методы. Для анализа были выбраны срезы пищевода *Mascamulatta* после иммуногистохимического окрашивания и докрасивания гематоксилином Майера. Микрофотографии получены с помощью микроскопа Olympus IX51 с камерой Olympus XC30. Изображения обрабатывали с помощью разработанной программы на ПК с процессором Intel Core i5-4690K, 3.50GHz со стандартными предустановленными параметрами, рассчитанными на детекцию DAB-хромогена.

Результаты исследования. При стандартном способе анализа микропрепаратов исследователь оценивает степень интенсивности окрашивания субъективно. При превышении порога восприятия область может быть оценена как положительно окрашенная, что служит потенциальным источником возникновения ошибок. Результаты исследования могут меняться в зависимости от интерпретации конкретным исследователем и степени его утомленности. Разработанная программа автоматически выполняет оценку площади окрашивания с надпороговыми значениями интенсивности без влияния субъективных факторов. Среднее время анализа одного изображения составляет 0.82 с, что значительно быстрее ручного метода оценки. Программа позволяет получить статистические данные по площади позитивного окрашивания в каждой группе детектируемого белка. Для каждого образца автоматически формируется композитное изображение с гистограммой распределения красителя и другими данными. Пороговый метод сегментации

областей окрашивания исключает оператор-зависимые погрешности оценки. Разработанный метод анализа изображений перспективен для экспресс-анализа содержания белков ВКМ при оценке протоколов децеллюляризации органов и тканей.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МСК КАК КРИТЕРИЙ ПРИ ВЫБОРЕ ИСТОЧНИКА ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ.

Енукашвили Н.И.³, Буклаев Д.С.⁴, Александрова Л.В.¹, Золина Т.Л.¹, Айзенштадт А.А.^{1,2}, Адылов Ш.Ф.¹

1. ООО «Покровский банк стволовых клеток».
2. НИЛ Клеточных технологий СЗГМУ им.Мечникова.
3. Институт цитологии РАН.
4. НИДОИ им. Г.И. Турнера МЗ РФ.
nie@newmail.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) рассматриваются как один из наиболее многообещающих источников для клеточной терапии. Дискуссионным вопросом является возможность использования аутологичных МСК при наличии системных заболеваний или заболеваний, связанных с нарушением формирования/регенерации соединительных тканей. Одним из подобных заболеваний является неverified (спонтанный) остеолит - синдром, при котором происходит спонтанная прогрессирующая резорбция костей. Цель исследования - определение остеогенного дифференцировочного потенциала МСК жировой ткани пациента со спонтанным остеолитом для оценки возможности применения аутологичных МСК при данном заболевании.

МСК были получены от пациента (муж., 5 лет) с диагнозом остеолит левой верхней конечности невыясненной этиологии при наличии информированного согласия. В качестве контрольных культур были использованы МСК пупочного канатика и жировой ткани из коллекции культур Покровского банка стволовых клеток. Дифференцировку первичных культур в остеогенном направлении начинали на 2-3 пассаже с помощью коммерческого набора MSCgo™ RapidOsteogenic (BioInd, Israel). Для дополнительной стимуляции остеогенной дифференцировки в часть луннодобавляли Остеоматрикс-крошку (КоннектБиофарм, РФ). Отложения солей кальция, маркер остеогенной дифференцировки, выявляли путем окрашивания ализариновым красным S. Величину минерализованных очагов остеогенеза оценивали, измеряя площадь окрашенных ализариновым красным S областей в 5 полях зрения. Поверхностные маркеры МСК выявляли с помощью меченных флуорохромами антител против CD34, CD45, CD14, CD44, CD90, CD105 и CD73 методом проточной цитометрии.

МСК пациента по морфологическим характеристикам и иммунофенотипу не отличались от контрольных культур и соответствовали стандартным минимальным критериям. При остеогенной индукции МСК пациента на 10-е сутки начинали формировать минерализованный матрикс.

При этом дифференцировка происходила в сроки, аналогичные МСК здоровых доноров и соответствующие протоколам производителя (время появления первых кальцификатов: 7.0 ± 1.2 и 7.4 ± 1.1 сут, средняя площадь на 10 день $65 \pm 4.4\%$ и $61 \pm 2.9\%$, для клеток пациента и контрольных соответственно). Добавление Остеоматрикса приводило к адгезии клеток на поверхности препарата и сокращению интервала от начала индукции до появления первых кальцификатов в среднем на 15%.

Таким образом, аутологичные МСК данного пациента с остеолитом по способности дифференцироваться в остеогенном направлении соответствуют контрольным культурам от здоровых доноров и могут быть использованы для аутотрансплантации. Добавление депротеинизированных препаратов кости ускоряет остеогенную дифференцировку как у пациента с остеолитом, так и у здоровых доноров.

Работа поддержана грантами: Программа РАН Молекулярная и клеточная биология (01200955639), РФФИ №16-34-01163, 16-34-00603.

ВЛИЯНИЕ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β 1-ГЛИКОПРОТЕИНА НА ПРОДУКЦИЮ ХЕМОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

Заморина С.А.¹, Литвинова Л.С.², Хазиахматова О.Г.², Юрова К.А.², Дунец Н.А.², Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.¹, Храмов П.В.¹, Раев М.Б.¹

1. ФГБУН Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской Академии наук, Пермь, Россия.
2. Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия. *hazik36@mail.ru*

Трофобластический β 1-гликопротеин (ТБГ) продуцируется клетками плаценты во время беременности, достигая концентрации 200-400 мг/мл в III триместре, что значительно превышает содержание других плацентарных белков. ТБГ регулирует иммунный ответ матери в отношении полуаллогенного эмбриона, но не подавляет иммунный ответ в отношении внешних агентов. В перспективе, эти свойства ТБГ можно использовать для направленной супрессии иммунного ответа при аутоиммунных заболеваниях.

Целью работы являлось выявление новых регуляторных эффектов ТБГ на уровне иммунокомпетентных клеток человека, в частности в отношении продукции хемокинов (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, IL-8).

ТБГ человека получали авторским методом [Раев М.Б., Патент РФ №2367449, 2009]. В эксперименте использовали суспензию мононуклеарных клеток (МНК), полученную в градиенте плотности фикоколл-урографии из периферической крови женщин репродуктивного возраста ($n=18$). МНК (1×10^7 кл/проба) инкубировали с ТБГ (1, 10 и 100 мкг/мл) в плоскодонном 24-луночном планшете в ППС (18 ч, 37°C, 5% CO₂). Концентрацию хемокинов в супернатантах клеточных культур оценивали методом проточной флюориметрии на автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем (Bio-PlexProHuman cytokine Group I Assays, Bio-Rad, США).

Установлено, что ТБГ достоверно ($p < 0,05$; t-критерий Стьюдента) угнетал как продукцию IL-8 (100 мкг/мл), так и продукцию MIP-1 α (1 и 100 мкг/мл). Не выявлено достоверных эффектов ТБГ в отношении MCP-1, MIP-1 β и RANTES. Таким образом, продемонстрированы ранее неизвестные супрессорные эффекты ТБГ в отношении продукции хемокинов (IL-8, MIP-1 α) мононуклеарными клетками человека. Полученные данные имеют как фундаментальное значение, позволяя внести вклад в объяснение феномена иммунной толерантности при беременности, так и прикладной смысл, заключающийся в потенциальной возможности фармакологического применения ТБГ. Работа поддержана грантом РФФИ мол_нр 16-34-50155.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКА НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO: РОЛЬ p53 И GSK3 β

Зосен Д.В.¹, Сапарова В.Б.², Немирич Д.В.², Глазова М.В.¹

1. Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук, г. Санкт-Петербург, Россия.

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

zosendenis@gmail.com

p53 и GSK3 β - известные участники регуляции самообновления и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток. Так, p53 позитивно регулирует дифференцировку, тогда как GSK3 β главным образом оказывает ингибирующий эффект. С другой стороны, обнаруживаются функциональные взаимодействия между p53 и GSK3 β . Исходя из того, что p53 и GSK3 β активно экспрессируются в эмбриональном и взрослом мозге, целью нашего исследования было изучение роли p53 и GSK3 β в регуляции пролиферации и дифференцировки нейрональных стволовых клеток (НСК). Эксперименты проводились на нескольких моделях - культурах нейросфер эмбрионального мышиноного мозга; культурах НСК, полученных из гиппокампа новорожденных мышей, и органотипических культурах гиппокампа половозрелых мышей линии CD1. Корректировка активности p53 и GSK3 β производилась с помощью селективных химических блокаторов. Полученные данные доказывают участие p53 и GSK3 β в регуляции пролиферативного состояния и дифференцировки НСК по нейрональному типу. Нами было отмечено, что в культурах с добавлением активатора p53 транскрипционный фактор Sox2 транслоцируется в цитоплазму, где, по данным литературы, Sox2 подвергается протеолитической деградации, что связывают с остановкой клеточного цикла и запуском дифференцировки. В свою очередь, в этих культурах Doublecortin- и MAP-2-позитивные клетки характеризовались длинными и разветвленными нейритами, что также является показателем более дифференцированного состояния клеток. В экспериментах было показано, что введение ингибитора GSK3 β увеличивает пролиферативный потенциал НСК, а также повышает процент MAP-2-позитивных клеток, не влияя на глиогенез. В то время как при активации GSK3 β количество астроцитов значительно преобладало над количеством нейронов. Таким образом, в нашем исследовании было показано, что и p53 и GSK3 β регулируют процессы дифференцировки и пролиферации НСК, где p53 направляет дифференцировку по нейрональному типу, тогда как GSK3 β преимущественно по глиальному. Понимание процессов диф-

ференцировки нейрональных стволовых клеток и нейрогенеза, а также роли p53 и GSK3 β в регуляции этих процессов, поможет не только пролить свет на базовые принципы пластичности мозга, но также способствует разработке терапии замещения клеток после травм мозга или при нейродегенеративных заболеваниях.

Работа поддержана фондом РФФИ (РФФИ-16-04-00777).

ПРИМЕНЕНИЕ МАРКЕРА KI-67 В ДИАГНОСТИКЕ СТАРЕНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ

Иванищева К.А.1, Севостьянова Н.Н.¹

1. ФГБУ ВПО «НовГУ», Великий Новгород.
ivanishcheva.ksenia@gmail.com

Оценка биологического возраста и темпа старения организма является актуальной задачей геронтологии. Морфофизиологическим эквивалентом старения является инволюция жизненно важных органов одной из основных регуляторных систем - иммунной. Поэтому изучение механизмов старения органов иммунной системы, тимуса и селезёнки, представляется важным для развития геронтологии.

Иммуногистохимическое исследование - особый вид исследования ткани, который предполагает использование специальных реактивов, содержащих антитела, меченные специальными веществами, на исследуемом материале, окрашенном с помощью красителей. Одним из таких реактивов является маркер пролиферации KI-67 — определителем скорости деления опухолевой клетки. Изучение пролиферативной активности и апоптоза проводили с применением мышинных моноклональных антител к протеинам KI-67.

В условиях физиологической нормы мозговое вещество тимуса было представлено преимущественно эпителиальными клетками и немногочисленными лимфоцитами. Тучные клетки встречались в междольковой соединительной ткани, вблизи кровеносных сосудов. В субкапсулярной зоне селезёнки и вдоль трабекул располагались многочисленные небольшие по размерам очаги миелоидного кроветворения с высокой интенсивностью иммуноокрашивания KI-67 — позитивный характер.

При ионизирующем облучении в ткани тимуса обнаружено отслоение участков наружной ядерной мембраны, набухание матрикса митохондрий, лизис крист, разрушение плотных контактов между тимоцитами. Облучение вызвало заметные изменения в стенках кровеносных сосудов. В селезёнке от начала облучения вокруг центральной артерии отмечалось опустошение фолликулов и их фрагментирование. В последующем происходило неполное восстановление органа.

После лазерного излучения визуальное исследование препаратов вилочковой железы выявлялась сохранность гистоархитектоники органа. Отмечалось усиление интенсивности KI-67 вдоль септальных перегородок, а при количественном анализе тучных клеток объемная плотность у облученных возрастала по отношению к контролю. В селезёнке KI-67

позитивные ядра пролиферирующих клеток выявлялись в очагах кроветворения и лимфоидных фолликулах.

Проведённые исследования показали, что применение маркера KI-67 иллюстрирует преобладание апоптоза клеток иммунной системы над пролиферацией в моделях радиационного старения. Доказана высокая чувствительность тимуса и селезёнки к ионизирующей радиации, в то время как лазерное излучение в тимусе и селезёнке вызывает обратимые изменения ультраструктуры клеток. Полученные данные открывают новые перспективы разработки новой модели ускоренного старения, максимально приближенного к естественному процессу и созданию эффективных геропротекторных препаратов.

Also levels cytokines expression increased in comparison with the routine treatment: HGF- 0,48 and 0,21 pmol/L ($p < 0,05$), TNF- α - 0,01 and 0,05 pmol/L ($p < 0,05$), IL-10 - 0,1 and 0,02 IU/ml ($p < 0,01$) correspondingly.

The data of the study showed positive influence of UCB derived MCF on immune system of the patients and it can be one more mechanism of effectiveness of UCB stem cells in the treatment of liver fibrosis. All the results of the study, including the data of clinical examination, biochemical tests and histologic pattern will be published soon.

UMBILICAL CORD BLOOD PROCESSING: QUALITY IMPROVEMENT

D. Ivogin^{1,2}, S. Novikova¹, A. Shumakova¹, I. Maslennikova^{1,2}, S. Adylov¹

1. Stem Cell Bank Pokrovskij, Saint-Petersburg, Russian Federation.
2. Scientific Laboratory of cell technologies, North-Western State Medical University, Saint-Petersburg, Russian Federation.
ida59m@mail.ru

It is known that stem cells (SC) count is of critical importance for regenerative medicine methods application effectiveness. This is particularly true for umbilical cord blood (UCB) as its volume is limited. That's why the methods of maximal SC isolation from UCB are developing permanently. The objective of the study was to evaluate the method of semi-automatic UCB processing in comparison with another UCB processing methods.

At the research work core was retrospective quantitative and qualitative analysis of UCB units ($n = 422$) collected in the city maternity clinics. All UCB units were collected during both the term birth, and cesarean section. For the comparison, UCB units with similar characteristics: volume above 70 ml, total nuclear cells (TNC) above 1100×10^6 were selected. Isolation of SCs from UCB units was carried out in the following ways:

- the double centrifugation method - 1st group ($n = 140$);
- automated system Sepax S100 ("Biosafe", Switzerland) - 2nd group ($n = 145$);
- semi-automatic system MacoPress Smart ("MacoPharma", France) - the 3rd group ($n = 137$).

The TNC recovery was taken as processing effectiveness index, so all UCB units has been tested on the following parameters: prior to and after processing- TNC count using hematology analyzer Coulter AcT diff 2 ("Beckman Coulter", USA). The TNC recovery after processing was calculated as a percentage of the TNC before processing.

All data are presented as median and range. The differences between the compared parameters were considered statistically significant at $p < 0,05$.

Median and range of TNC recovery by double centrifugation, automatic and semi-automatic methods amounted 77,2% (49,7-99,4), 81,1% (58,6-92,4) and 87,1% (47,0-115,1), respectively ($p < 0,05$ semi-automatic compared with the double centrifugation and automatic separation methods). Interestingly, that TNC recovery values of UCB units, processed with semi-automatic method, positively correlate with pre-processing hematocrit values ($R^2 = 0,158$).

Thus, semi-automatic UCB processing system demonstrated high efficiency and its utilization can provide sufficient amount of SC for regenerative medicine application. Also pre-processing hematocrit value can be prognostic index for UCB SC isolation and possibly use as additional inclusion criteria for UCB units processing.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В КОМПЛЕКСНОМ БЕЗОПЕРАЦИОННОМ ЛЕЧЕНИИ БРОНХИАЛЬНЫХ СВИЩЕЙ ПОСЛЕ ПНЕВМОНЭКТОМИИ

Ионов П.М.¹, Юркевич Ю.В.², Акопов А.Л.³, Дейнега И.В.¹, Беседина Н.К.¹,
Адылов Ш.Ф.⁴, Александрова Л.В.⁴, Золина Т.Л.⁴

1. ГБУЗ Городская Покровская больница, Санкт-Петербург, Россия.
2. ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.
3. ГБОУ ВПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.
4. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия.
ionovpavelm@mail.ru

Совершенствование оперативных и малоинвазивных методов в торакальной хирургии до конца не решило проблему лечения послеоперационных бронхиальных свищей. Эндоскопические способы закрытия фистул достаточно простые и безопасные не всегда являются эффективными. Одним из путей совершенствования данного направления может быть эндобронхиальная окклюзия свища с использованием клеточных технологий.

Цель исследования заключалась в оценке эффективности лечения послеоперационных бронхиальных свищей путем эндоскопических инъекций суспензии культивированных аллогенных фибробластов в подслизистый слой зоны фистулы.

В исследование включено 14 пациентов с бронхоплевральными свищами после пневмонэктомии, выполненных по поводу рака легкого (78,6%), инфекционной деструкции (14,3%) и туберкулеза (7,1%). Диаметр дефекта составлял от 2 до 10 мм. Методика заключалась в эндобронхиальной подслизистой инъекции суспензии культивированных аллогенных фибробластов человека в область фистулы. Концентрация аллофибробластов составляла $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Культивирование фибробластов осуществляли с использованием общепринятых методических приемов. Введение препарата осуществлялось с помощью бронхоскопической канюли в зону свища из 2-5 точек общим объемом 1,5 мл. Состояние культи бронха и остаточной плевральной полости контролировалось выполнением бронхоскопии, рентгенографии легких, КТ.

Установлено, что после однократного введения суспензии фибробластов свищ закрылся в 6 наблюдениях из 14 (43%) в течение 4 недель. У 8 больных свищевой ход сохранялся, эндоскопическая инъекция фибробластов проведена повторно, что привело к закрытию свища

у четырех пациентов (29%). У двух больных (14%) бронхиальная фистула закрылась при третьем введении клеток. Стоит отметить, что у одного пациента при трехкратном эндоскопическом введении фибробластов удалось ликвидировать свищ диаметром 10 мм. При эндоскопическом и рентгенологическом контроле через один год после лечения у 12 больных не было признаков рецидива свища культи бронха. В двух случаях (14%) бронхиальный свищ уменьшился в диаметре, но не закрылся (больные после правосторонней пневмонэктомии по поводу рака легкого с крайней степенью белково-энергетической недостаточности). Следовательно, эндобронхиальное введение аллофибробластов в зону свищевой ходы позволило получить стабильный окклюзионный эффект у 86% пациентов, что подтверждает необходимость совершенствования малоинвазивных методов лечения бронхиальных фистул с помощью клеточных технологий.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ПОЛИЛАКТИДНЫХ СКАФФОЛДАХ

Каширова А.О.¹, Никонов П.О.², Нащекина Ю.А.²

1. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.
2. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
k-alyona94@yandex.ru

Введение. Для культивирования клеток используют трехмерные полимерные конструкции - скаффолды, способствующие формированию тканеподобных структур, приближенных по своим свойствам к естественному состоянию клеток в тканях организма с наибольшей функциональной активностью.

Эффективность создаваемых конструкций зависит от свойств использованного материала, структуры, модификации поверхности, а также условий посадки, культивирования и направленной дифференцировки клеток.

Их поверхность может быть функционализирована за счет химического присоединения биомолекул, которые способствуют адгезии клеток к поверхности скаффолда. Модификация природными биоматериалами ведет к лучшему прикреплению, распластыванию, размножению клеток, а также способности кангиогенезу.

Цель работы. Модификация поверхности скаффолдов биологическими агентами улучшающими их биосовместимость; культивирование клеток на сформированных скаффолдах.

Для исследования использовали полилактидные скаффолды в виде пленок. Поверхность скаффолдов модифицировали аргинином. На скаффолдах культивировали МСК кролика в течение 5 суток. Сравнивали степень расплываемости мезенхимных стволовых клеток на приготовленных скаффолдах. Структуру цитоскелета анализировали с использованием конфокальной микроскопии.

Результаты. При обработке скаффолдов в водном и водно-спиртовом растворе аргинина показано, что сорбция аргинина зависит от времени обработки пленки, концентрации аргинина в растворе и содержания спирта в системе. При анализе структуры актинового цитоскелета установлены оптимальные условия модификации поверхности скаффолда аргинином. Наиболее расплываемые клетки обнаружены на образце пленки, которую обрабатывали в течение 10 минут в 1М растворе аргинина в воде.

Выводы. Культивирование мезенхимных стволовых клеток на сформированных полилактидных скаффолдах позволяет оценить эффективность модификации поверхности скаффолдов биологическими агентами.

Работа выполнена при поддержке РНФ № 14-50-00068.

ИССЛЕДОВАНИЕ ЦИТОСОВМЕСТИМОСТИ БРУШИТОВОГО ЦЕМЕНТА НА ОСНОВЕ АЛЬФА-ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА, ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

Кирсанова В.А.¹, Фадеева И.В.², Свиридова И.К.¹, Сергеева Н.С.¹, Ахмедова С.А.¹, Фомин А.С.², Рыжов А.П.², Евдокимов П.В.³, Путляев В.И.³, Кнотько А.В.³

1. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена - филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия.
2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова Российской академии наук, г. Москва, Россия.
3. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», факультет наук о материалах, г. Москва, Россия.
prognoz.06@mai.ru

Для замещения костных дефектов в онкологии после удаления первичных и метастатических опухолей, в травматологии и ортопедии традиционно используются кальцийфосфатные(КФ) керамические материалы. Клиническое использование цементов, несмотря на их «привлекательность», в частности, для закрытия трещин или заполнения дефектов сложной геометрии, ограничивается их недостатками. Так, при затвердевании брушитовых цементов (БЦ) в зоне дефекта резко снижается рН из-за наличия кислотного компонента затворяющей жидкости, что сказывается на их цито- и биосовместимости. Кроме того, БЦ имеют недостаточную прочность и короткое время схватывания.

Цель работы - исследование цитосовместимости БЦ и композиционных БЦ (КБЦ), полученных по новым технологиям.

Материалы и методы. Исследованы БЦ состава брушит/гранулы карбонатгидроксиапатита и КБЦ, упрочнённый полилактидом (ПЛ) путем введения жидкого БЦ в ПЛ каркасы методом экструзии. Время схватывания БЦ и КБЦ -10-12 мин; кислотность в окружающей среде нормализуется в течение 1 часа после отвердевания; прочность на сжатие -15 и 35 МПа, соответственно. In vitro исследования образцов БЦ и КБЦ проводили на культуре иммортализованных фибробластов человека (ФЧ),

штамм 1608hTERT и остеосаркомы человека MG-63. На этапах культивирования (до 14 суток) оценивали динамику изменения клеточной популяции (МТТ-тест).

Результаты и обсуждение. Выявлено отсутствие цитотоксичности образцов БЦ и КБЦ и удовлетворительные матриксные свойства их поверхности. Через 7 суток величина пула жизнеспособных клеток (ПЖК) в лунках, содержащих БЦ и КБЦ, составила 90,6 и 85,3% для ФЧ и 74,1 и 70,9% для MG-63 по отношению к контролю, соответственно. К концу второй недели культивирования этот показатель для ФЧ составил 143,9 и 117,4%, для MG-63 -119,2 и 111,5%, соответственно. Микроскопия показала равномерное заселение клетками поверхности образцов БЦ и КБЦ. Полученные данные свидетельствуют о цитосовместимости разработанных образцов цементов и целесообразности проведения исследования их биосовместимости и остеозамещающих потенциалов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ-офи №15-29-04871

ПУПОЧНЫЙ КАНАТИК - ИСТОЧНИК МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Кольцова А.М.¹, Зенин В.В.¹, Полянская Г.Г.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия.
koltsova.am@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки человека (МСКч) являются перспективным материалом для применения в клеточной терапии. МСКч присутствуют в большинстве тканей, однако их получение в достаточном для работы количестве имеет ограничения. Это связано с инвазивностью методов их получения и с ограниченностью их пролиферативного потенциала. Поиск новых доступных источников МСКч - актуальная задача для исследователей, работающих в данной области клеточной биологии.

Одним из источников МСКч может быть Вартонов студень - слизистая соединительная ткань пупочного канатика. Его получение не требует оперативного вмешательства, и, учитывая размеры самой пуповины (от 50 до 70 см), может быть выделен в большом объеме. Кроме того, клетки, входящие в его состав являются неонатальными и должны обладать большим, по сравнению с клетками от взрослого донора, пролиферативным потенциалом.

Целью данного исследования было выделение клеток, входящих в состав Вартонова студня пупочного канатика человека, и их полная характеристика с позиции соответствия МСКч.

Материалы и методы. Из пупочного канатика вырезали ткань Вартонова студня, фрагментировали и помещали в чашку Петри с культуральной средой. Образующиеся вокруг фрагментов ткани зоны роста фибробластоподобных клеток изолировали и культивировали стандартным методом. В результате была получена новая неиммортилизованная фибробластоподобная линия с характерной для МСКч экспрессией поверхностных маркеров: CD44, CD73, CD90, CD105 и HLA-ABC и отсутствием экспрессии CD34, CD45 и HLA-DR. Была показана способность этих клеток направленно дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Кроме того, иммунофлуоресцентный анализ выявил экспрессию маркеров, характерных для производных трех зародышевых листков-эктодермы (нестин), мезодермы (альфа-актинин) и энтодермы (альфафетопротейн), что может свидетельствовать о расширенном дифференцировочном потенциале данной клеточной популяции.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что новая клеточная линия имеет статус МСКч. Последующая работа будет направлена на определение основных ростовых характеристик данной линии, кардио-

типический анализ, а также ее особенностей, определяемых спецификой тканевой локализации, что в свою очередь может проявляться, например, в дифференцировочном потенциале, и соответственно определит область ее применения.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПО ПОВЕРХНОСТИ И НАРАБОТКА ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА КЛЕТОК С ХОНДРОГЕННЫМ ПОТЕНЦИАЛОМ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПОЛИЛАКТИДНЫХ СКАФФОЛДАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТОМ

Копелев П.В.^{1,2}, Александрова С.А.¹, Нащекина Ю.А.^{1,2}, Блинова М.И.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
2. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия.
paха94@bk.ru

В настоящее время остаются актуальными поиски источников клеток и материалов, подходящих для тканевой инженерии хряща. В данной работе изучали возможность культивирования клеток с хондрогенным потенциалом на модифицированных полилактидных скаффолдах. Использовали три типа клеток: первичные культуры мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, синовиальной ткани и хондроцитов суставного хряща. Клетки выделяли из разных участков конечностей новорожденного кролика породы Шиншилла. Дифференцировку в хондрогенном направлении проводили в индукционной среде StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Life Technologies, США). Для культивирования клеток использовали скаффолды из поли(L-L)лактида, полученные методом выщелачивания. На стерильные скаффолды наносили раствор хондроитинсульфата (1 г/мл) (Sigma, USA) и оставляли до высыхания. Проводили прижизненное наблюдение под инвертированным микроскопом в процессе инкубации клеток в течение 26 сут с последующей фиксацией клеток и исследованием их методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Jeol JSM-35C, Япония).

Прижизненные наблюдения выявили, что часть клеток не прикрепилась к скаффолдам, а адгезировала к поверхности культурального сосуда и сохраняла нормальную морфологию. Также можно было обнаружить скопления клеток, окруженных матриксом и располагающихся в порах скаффолдов. Наиболее крупные скопления были выявлены при культивировании ММСК костного мозга в условиях хондрогенной среды. Исследование с помощью СЭМ распределения клеток выявило, что клетки всех типов прикреплялись к поверхности скаффолдов, распластывались, мигрировали и формировали монослой.

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 14-50-00068 и при финансовой поддержке ФАНО России.

ПОРИСТЫЕ МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДА ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

Крашенинников С.В.^{1,2}, Григорьев Т.Е., Загоскин Ю.Д.¹, Бухарова Т.Б.³, Васильева А.В.^{2,3}, Леонов Г.Е.^{2,3}, Гольдштейн Д.В.^{2,3}, Кулаков А.А.²

1. НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия.
2. ФГБУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Минздрава России, Москва, Россия.
3. ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия.
timgrigo@yandex.ru

Полилактиды широко применяются в биомедицине и тканевой инженерии, так как они совместимы с тканями человека, способны к биоразложению с образованием нетоксичных продуктов. Важнейшей задачей является получение полилактидов со строго заданными размерами взаимосвязанных пор: увеличение площади поверхности повышает эффективность заселения клетками заданного объема полилактидной матрицы, что позволяет добиться лучших показателей регенерации при применении матриц на основе этого класса веществ. Цель работы - создание матриц на основе полилактидов с регулируемым размером и формой пор.

Для выявления влияния молекулярной массы полимера на структуру и свойства матриц использовали полилактиды с молекулярной массой 50-450 кДа. С применением гель-сублимационной технологии были получены трехмерные пористые материалы с пористостью в диапазоне 92-96% и диаметром пор 3-40 мкм. Материалы были исследованы на цитотоксичность с помощью МТТ-теста на культурах мультипотентных стромальных клеток (МСК) человека. Для изучения клеточной адгезии на поверхности матриц клетки метили витальным красителем РКН-26 и исследовали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Было изучено влияние технологических параметров подготовки растворов: метод «закалки» и состав системы, на морфологию губок. Полученные материалы показали возможность варьирования прочности в пределах 0,4 - 3 МПа, что позволяет их использование в качестве костных матриц. Проанализировано влияние концентрации и молекулярной массы полимеров на структурные и прочностные свойства матриц. Показано отсутствие цитотоксического действия полилактидов на культуры МСК после 1 и 7 суток инкубации и способность клеток прикрепляться и распластываться на поверхности исследуемых матриц, что свидетельствует о цитосовместимости разрабатываемых материалов.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00298).

ДИНАМИЧЕСКАЯ КОНДУКТОМЕТРИЯ КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЕТЕРГЕНТОВ ПРИ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ

Кувда Е.В.¹, Губарева Е.А.¹, Гуменюк И.С.¹, Сотниченко А.С.¹, Гилевич И.В.¹, Накохов Р.З.¹

1. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия.
elenakuevda@yandex.ru

Технологии регенеративной медицины подразумевают разработку протоколов получения биологических каркасов без иммуногенных свойств с воспроизведением структуры нативных органов. Детергент-энзиматический метод получения каркасов представляется оптимальным, однако повреждающее воздействие децеллюляризирующих агентов рекомендуется снизить при сохранении их эффективности. Измерение удельного сопротивления в динамике позволяет оценить процессы разрушения клеток и прекратить воздействие детергента до повреждения структуры каркаса.

Материалы и методы. Работа выполнена на 10 крысах-самцах линии Wistar при соблюдении надлежащих этических норм. Эксплантацию легких проводили после эвтаназии животных барбитуратами. Децеллюляризацию выполняли детергент-энзиматическим методом с дезоксихолатом натрия в качестве основного детергента, опираясь на разработанный авторами протокол, и проведением непрерывной проточной кондуктометрии рабочего раствора. Показатели электропроводности регистрировались модульной системой на базе микроконтроллера ATmega328 с частотой 500 измерений в секунду. При достижении плато ионного равновесия воздействие детергента прекращали. После завершения обработки образцы подвергали гистологическому исследованию для оценки эффективности и качества децеллюляризации.

Результаты исследования. Ионное равновесие раствора наступало через 55 минут от начала воздействия детергента без тенденции к изменению при увеличении продолжительности обработки. Легкие крысы приобретали опалесцирующе-белую окраску, характерную для децеллюляризованных органов. При окрашивании флуорофором DAPI ядра не визуализировались. Окрашивание гематоксилином и эозином не выявило клеточных элементов и повреждений матрикса. Альвеолярные перегородки сохранили целостность, характерную для нативных легких. Сравнение морфологической картины с результатами, полученными при децеллюляризации легких разработанным ранее авторским протоколом

с общим временем воздействия дезоксихолата 2 часа, выявило значительно меньшее повреждение матрикса.

Динамическая кондуктометрия растворов детергентов позволяет предотвращать чрезмерное повреждающее воздействие детергентов и проводить эффективную децеллюляризацию матриксов с сохранением структуры.

ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АНТИСЕПТИКОВ ПРИ СТЕРИЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ КАРКАСОВ ЛЕГКИХ КРЫСЫ

Кувда Е.В.¹, Губарева Е.А.¹, Басов А.А.¹, Сотниченко А.С.¹, Гуменюк И.С.¹, Качанова О.А.¹, Гилевич И.В.¹, Накохов Р.З.¹

1. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия.
elenakuevda@yandex.ru

Для тканевой инженерии важен вопрос длительного хранения каркасов без угрозы их контаминации. Существующие способы стерилизации допускают возможность повреждения каркасов. Нами изучены цитотоксические свойства растворов октенисепта и хлоргексидина при воздействии на мезенхимные стволовые клетки (МСК), бактериостатическое действие препаратов, их влияние на морфологическую структуру и биофизические свойства каркасов.

Материалы и методы. Биологические каркасы получены путем децеллюляризации легких крысы детергент-энзиматическим методом по авторскому протоколу. Забор органокомплексов у 15 самцов линии Wistar проведен в соответствии с этическими нормами. Для оценки влияния антисептиков изучено по 5 образцов каркасов легких без дополнительной обработки, а также обработанных октенисептом в разведении 1:6 и хлоргексидином в разведении 1:10. Концентрации антисептиков выбраны после предварительного изучения цитотоксичности антимикробных средств, длительность обработки антисептиками составила 24 часа. Каркасы засеивали статически в 96-луночных планшетах из расчета 20000 МСК на лунку. Оценка качества каркасов проводили рутинными гистологическими методами, методами хемилюминесценции, бактериологическими методами и путем расчета жизнеспособности (ЖСП) клеток на каркасах использованием ХТТ-реагента.

Результаты исследования показали, что обработка антисептиками не вызывает визуальных изменений морфологической структуры каркасов. Бактериостатический эффект отмечен в обоих случаях применения антисептиков. При воздействии хлоргексидина в концентрации 1:10 показатель площади собственной хемилюминесценции за 100 секунд ($ПСХ_{100}$) увеличивается в 4,1 раза по сравнению с интактными каркасами ($p \leq 0,05$), достоверных изменений большинства изученных параметров хемилюминесценции при обработке октенисептом не отмечено. ЖСП клеток на каркасе, обработанном хлоргексидином, составила 66,71%, при использовании октенисепта - 0,07%.

Увеличение ПСХ₁₀₀ после обработки хлоргексидином обуславливает дополнительное разрушение внеклеточных антиоксидантных факторов без повреждения матрикса, что подтверждается высокой ЖСП клеток на каркасе. Указанная концентрация хлоргексидина представляется наименее токсичной для стерилизации биологических каркасов.

ДОЗОЗАВИСИМОЕ СНИЖЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МУЛЬТИПОНЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК (ММСК) IN VITRO ПОД ДЕЙСТВИЕМ НПВП

Лабутин Д.В.¹, Воробьев К.А.¹, Божкова С.А.¹

1. ФГБУ РНИИТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, Россия.
mailbox@dlabutin.com

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) широко применяют для купирования болевого синдрома при остеоартрозе и переломах костей. Данные об их влиянии на регенеративные процессы в тканях костей и хряща крайне противоречивы. Цель исследования: оценка воздействия НПВП на жизнеспособность ММСК in vitro.

Материалы и методы. Клетки костного мозга, выделенные из бедренных костей крыс (n=3), культивировали в среде DMEM + 15% FCS (Gibco, Великобритания) при 37°C (5% CO₂) до третьего пассажа. Чистоту культуры ММСК оценивали на проточном цитометре FACS Aria III с мышинными антителами CD90-FITC, CD45-PE (BD Pharmingen, США), оценку жизнеспособности ММСК проводили методом колориметрии. ММСК в количестве 15,000 высевали в 24-луночные планшеты (Eppendorf, Германия). Через 24 часа в каждые три лунки добавляли среду с двукратными разведениями (от 800 до 25 мкг/мл) кетопрофена (Keto) или диклофенака натрия (Dicl) (ОАО Синтез, Россия). Клетки контрольных лунок культивировали без НПВП. Через 72 часа в лунки был добавлен 1 мг/мл реагента МТТ (MP Biomedicals, США), после 2-часовой инкубации среду заменяли на 200 мкл ДМСО. Оптическую плотность (OD) полученного раствора измеряли в 96-луночных планшетах на фотометре Thermo iEMS (540/620 нм). Результаты представлены в виде долей средних значений OD со стандартной ошибкой средней по отношению к контролю. Выполнен двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Данна.

Результаты. Dicl в концентрациях 100, 200, 400 и 800 мкг/мл приводил к снижению их жизнеспособности ММСК до $0,67 \pm 0,03$ ($P < 0,05$), $0,31 \pm 0,06$ ($P < 0,0001$), $0,07 \pm 0,02$ и $0,04 \pm 0,01$ ($P < 0,0001$), соответственно. При культивировании клеток с Keto в концентрациях 400 и 800 мкг/мл данный показатель составил $0,68 \pm 0,10$ ($P < 0,05$) и $0,28 \pm 0,07$ ($P < 0,0001$), соответственно. При этом эффект Dicl в концентрациях 200 ($P < 0,05$) и 400 ($P < 0,0001$) мкг/мл был значительнее, чем Keto.

Заключение. Дозозависимое снижение жизнеспособности ММСК под действием Dicl и Keto происходило при концентрациях, существенно превышающих их максимальные концентрации в крови. Таким обра-

зом, маловероятно прямое повреждающее действие терапевтических доз тестируемых НПВП на ММСК in vivo. Однако, также следует оценивать влияние этих препаратов на остео- и хондрогенез.

ДИСБАЛАНС РОСТА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ КРАТКОСРОЧНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С РЕЛЬЕФНЫМ КАЛЬЦИЙФОСФАТНЫМ ПОКРЫТИЕМ НА ТИТАНЕ

Литвинова Л.С.¹, Шуплецова В.В.¹, Дунец Н.А.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Юрова К.А.¹, Шаркеев Ю.П.^{2,3}, Комарова Е.Г.³, Седельникова М.Б.³, Хлусова М.Ю.⁴, Хлусов И.А.^{1,2,4},

1. Балтийский федеральный университет им. И. Канта, Калининград, Россия.
2. Томский политехнический университет, Томск, Россия.
3. Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия.
4. Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия.
khlusov63@mail.ru

Изучено морфофункциональное состояние 24-часовой 2D-культуры (на пластиковой поверхности культуральных планшетов) и 3D-культуры лейкозных (Jurkat Т-клетки) и стромальных опухолевых клеток (линия MG-63) человека. Состояние трехмерной культуры клеток имитировали при помощи добавления в культуру клеток подложек (10×10×1 мм³) из коммерчески чистого титана, несущих рельефное (индекс шероховатости Ra = 2-5 мкм) микродуговое двустороннее кальцийфосфатное (КФ) покрытие, симулирующее состояние минерального матрикса регенерирующей костной ткани. КФ покрытие слабо растворялось в модельной биологической жидкости, что было зафиксировано по минимальному выходу в раствор кальция и фосфат-ионов. Тем не менее, керамоподобные микрорельефные КФ покрытия, в отличие от TiO₂ покрытий, вносили существенный дисбаланс в молекулярные процессы дифференцировки, секреции, апоптоза и некроза, что приводило к снижению выживаемости И РОСТА культуры опухолевых клеток.

Результаты могут иметь значение при выборе остеопластического материала для органосберегающего остеосинтеза у больных, страдающих гемобластозами и опухолевыми поражениями костной ткани.

Работа выполнена за счет грантов Российского научного фонда (проект 16-15-10031, анализ результатов культивирования клеток) и РФФИ (проект 15-03-07659, изготовление трехмерных матриц для культивирования клеток и тестирование их физико-химических свойств).

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА В ТЕРАПИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лыков А.П.^{1,2}, Бондаренко Н.А.^{1,2}, Суровцева М.А.^{1,2}, Ким И.И.^{1,2}, Кабаков А.В.¹, Казаков О.В.¹, Бгатов Н.П.¹, Повещенко О.В.^{1,2}, Повещенко А.Ф.^{1,2}

1. НИИ клинической и экспериментальной лимфологии, Новосибирск, РФ.
2. НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н.Мешалкина, Новосибирск, РФ. *aplykov2@mail.ru*

Терапия мультипотентными мезенхимальными стромальными/стволовыми клетками (ММСК) позиционируется как новый и обнадеживающий способ лечения ряда воспалительно-дегенеративных процессов, так как они являются прогениторными клетками для всех типов соединительной ткани, снижают апоптоз, модулируют воспаление и иммунный ответ. ММСК мобилизуются и мигрируют в зону ишемии, где продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, способствующих ангиогенезу и ремодулированию внеклеточного матрикса. Цель исследования - оценка клинической эффективности клеточного продукта в терапии экспериментального острого инфаркта миокарда, экспериментальной диабетической язвы, экспериментальном воспалительном процессе в кишечнике и дегенерации межпозвонкового диска. В экспериментах использовали костномозговые (КМ)-ММСК от 2-4 пассажа. Кондиционную среду (КС) от КМ-ММСК собирали при смене питательных сред от КМ-ММСК 2-4 пассажа. Сахарный диабет у мышей-самцов C₅₇Bl₆ индуцировали внутрибрюшинным введением стрептозотоцина. Термический ожог кожи модулировали прижиганием металлическим шпателем после обезболивания. Острый инфаркт миокарда у крыс-самок Wistar модулировали перевязкой левой передней нисходящей коронарной артерии. Дегенеративный процесс в межпозвонковых дисках хвостового отдела у 30 крыс-самцов Wistar индуцировали пункцией пульпозного ядра. Экспериментальный воспалительный процесс в кишечнике у мышей-самцов C₅₇Bl₆ индуцировали 3,5% раствором декстран сульфата, добавленного в воду для питья. КМ-ММСК или КС от КМ-ММСК вводили внутривенно или в область патологического процесса. Показано, что клеточный продукт способствует уменьшению выраженности некритических процессов в области ишемии миокарда, эпителизации ран, снижению выраженности воспалительной реакции и увеличению количества клеток Панета в криптах тонкой кишки, регенерации поврежденного межпозвоночного диска.

Заключение. Таким образом, показана терапевтическая эффективность КМ-ММСК и продуктов секреции КМ-ММСК при воспалительно-дегенеративных процессах.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ЭПИТЕЛИЯ КИШЕЧНИКА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ФАКТОРОВ

Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Ястребов А.П.^{1,2}

1. ГАУЗСО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, РФ.

2. ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет,

Екатеринбург, РФ.

makliu@mail.ru

Несмотря на значительное количество публикаций, посвященных изучению действия стволовых клеток, остается неизученной возможность использования аллогенной сочетанной трансплантации стволовых клеток, выделенных из плаценты, для активации регенерации быстрообновляющихся тканей в условиях старения организма, а также в условиях действия экстремальных факторов.

Эксперименты выполнены на 72 зрелых лабораторных мышках-самцах. Животным опытной группы внутривенно вводились ММСК и ГСК соответственно в дозе 6 млн. клеток/кг и 330 тыс. клеток/кг, суспендированные в 0,2 мл 0,9 % раствора NaCl. Животным контрольной группы вводили 0,9 % раствор NaCl — 0,2 мл внутривенно. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после экстремального воздействия однократно. Забой животных осуществлялся на 1 и 7 сутки после облучения и на 1 и 5 сутки после острой кровопотери. Получение клеточной культуры ММСК и ГСК производилось из хориона плаценты лабораторных животных. Выделение ГСК осуществлялось методом позитивной иммуномагнитной сепарации по антигенам SCA-1 и iCD 117. Методом проточной цитометрии оценивалось содержание ГСК с иммунофенотипом положительных по CD117, Sca-1 и отрицательных по Lin⁻ (CD45, C3e, Ly-6G, M1/70, Ter-119) и составило 70-93%. Принадлежность выделенных клеток к ГСК была подтверждена проведением стандартного теста колониеобразования в метилцеллюлозной среде MethoCult. При трансплантации лабораторным животным была использована культура ММСК третьего пассажа. Жизнеспособность выделенных клеток перед трансплантацией составляла 95-97%. При облучении поглощенная доза составила 4,0 Гр. Острая кровопотеря была вызвана кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2 % от массы тела животного.

Оценка регенераторных процессов в слизистой оболочке тощей кишки осуществлялась с помощью расчетов индекса пролиферации (ИП), апоптотического индекса (АИ). Средняя клеточность в одной крипте (СКК)

была определена как отношение числа криптальных клеток к количеству анализированных крипт.

В условиях воздействия экстремальных факторов сочетанная трансплантация плацентарных ММСК и ГСК приводит к увеличению содержания эпителиоцитов крипт тощей кишки. Это достигается за счет повышения пролиферативной активности и угнетения апоптоза эпителиоцитов.

ВЛИЯНИЕ 3D КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ НА МЕМБРАНАХ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Малюченко Н.В.¹, Носенко М.А.², Мойсенович А.М.¹, Архипова А.Ю.¹,
Друцкая М.С.², Мойсенович М.М.¹

1. Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, РФ.
2. ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
Москва, РФ.
mal_nat@mail.ru

Мышечные эмбриональные фибробласты (МЭФ) активно используются в исследованиях процессов регуляции клеточного цикла, трансформации, сенесценции, апоптоза, дифференцировки клеток, а также в изучении регенерации тканевых повреждений. МЭФ имеют ряд свойств, которые сближают их со стволовыми клетками, в частности: схожая морфология, маркеры CD90, CD73, CD105, а также способность к дифференцировке в остециты, адипоциты и хондроциты. Большинство исследований *in vitro* МЭФ проводятся на культуральном пластике, поверхность которого не воспроизводит сложное трехмерное пространство существования клеток в организме. *In vivo* такое пространство опосредует крайне важную сигнализацию для пролиферации и дифференцировки большинства типов клеток. Созданный нами фиброин-желатиновый (ФЖ) скаффолд имеет пористую структуру со сложной внутренней и внешней топографией, которая напоминает архитектуру соединительных тканей и, таким образом, в какой-то степени имитирует благоприятные для развития фибробластов 3D условия. Было показано, что 3D ФЖ микрочастицы, представляющие 200-400 мкм фрагменты скаффолда, эффективно поддерживают адгезию и пролиферацию МЭФ. При этом рост МЭФ в 3D-микрочастицах приводит к изменению некоторых функциональных свойств клеток по сравнению с 2D условиями. С помощью иммунофлуоресцентных и молекулярно-генетических методов была обнаружена повышенная экспрессия молекул адгезии ICAM-1 в 3D условиях. При этом на 2D субстратах выраженной экспрессии ICAM-1 не наблюдали. Изменение экспрессии молекул адгезии в 3D сопровождалось изменениями в пространственной организации актинового цитоскелета в МЭФ. Исследование молекулярных механизмов индукции ICAM-1 продемонстрировало, что при трехмерном культивировании в МЭФ индуцируется транскрипция генов семейства AP-1 cFos, и Junb, но не cJun и Junb. Работа осуществлена при поддержке грантов РФФИ №15-29-04903 и РФФИ №14-04-01799.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ КЛЕТКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СЛОЯ ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Матвеева В.А.¹, Артемьева Л.В.¹, Матвеев А.Л.¹, Чичерина Г.С.², Потапова О.Ф.², Майбородин И.В.¹, Овсянникова Т.В.¹, Попова Ж.Ю.¹, Ефремов Я.А.³,
Алешина Т.Е.³, Морозов В.В.¹

1 Институт химической биологии и фундаментальной медицины
СО РАН, г. Новосибирск, Россия.
2 Институт систематики и экологии животных СО РАН,
г. Новосибирск, Россия.
3 Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия.
vam@niboch.nsc.ru

Бесплодие, вызванное нарушением функций эндометрия, занимает одно из первых мест среди гинекологических заболеваний. Используемое в настоящее время лечение этой дисфункции не всегда эффективно. Одним из новых подходов может стать терапия стволовыми клетками эндометрия.

Клетки выделяли из диагностических образцов пайпель-биопсии функционального слоя эндометрия женщин с диагнозом эндометрит методом ферментативной диссоциации и культивировали до третьего субкультивирования. По результатам световой микроскопии, проточной цитометрии и иммуноцитохимического окрашивания, культивируемые *in vitro* клетки прикреплялись к пластику, имели фибробластоподобную морфологию, фенотип: CD14-, CD31-, CD34-, CD38-, CD45, CD45RA-, HLA-DR-, a-SMA-, CD326-, CD71+, CD73+, CD90+, CD146+, пролиферировали до и после криохранения, что соответствует морфологии и фенотипу мезенхимальных стволовых клеток эндометрия. По результатам цитологического окрашивания, после введения этих клеток в рог матки псевдобеременных (от скрещивания с вазэктомированными самцами) самок мышей линии BALB/c наблюдали гипертрофию эндометрия, рост числа секреторных желез, усиление васкуляризации эндометрия и мышечной оболочки матки, в отдельных случаях - децидуализацию эндометрия в сравнении с рогом, в который вводили физиологический раствор. Васкуляризация эндометрия и мышечной оболочки матки, образование новых функционально активных маточных желез, децидуализация эндометрия предположительно связаны с влиянием ростовых факторов, секреторных введенными клетками. Для определения механизмов восстановления ткани эндометрия с участием стволовых клеток функционального слоя эндометрия, возможности использования их при лечении бесплодия, связанного с недостаточным развитием эндометрия, необходимы дальнейшие исследования.

СУСПЕНЗИОННЫЙ СФЕРОИДОПОДОБНЫЙ СЛОЙ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СОДЕРЖИТ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ОПУХОЛИ?

Моисеева Е.В.¹, Антипова Н.В.¹, Аронов Д.А.¹, Семушина С.Г.¹

1. ИБХ РАН, Москва, Россия.
evmoise@gmail.com

Недостатком стандартных клеточных опухолевых линий является отсутствие микроокружения, играющего важную роль при прогрессии опухоли и развитии лекарственной резистентности. Цель: изучить свойства индивидуальных культур (ИК) клеток из аденокарцином молочной железы (АКМЖ) мыши в течение месяца и более.

Материалы и методы. Образцы тканей выделяли из АКМЖ самок мышей нашей коллекции (перевиваемые - от низкоракковой линии BALB/c и спонтанные - от высокоракковых линий BLRB и CBRB). Полученные клеточные суспензии культивировали в среде DMEM с 10% СПК. Проводили патоморфологический анализ исходных опухолей (окраска гематоксилин-эозином). Оценку морфологии и роста клеток ИК осуществляли визуально (NikonDiaphot 300). Экспрессию маркеров клеток моноцитарно-макрофагального (MM) ряда (F4/80⁺CD11b⁺) и эпителиального происхождения (CD45-CD44⁺) определяли с помощью проточной цитометрии.

Результаты. 1. Низкоракковая линия BALB/c (перевиваемые АКМЖ от разных доноров). Наблюдалось отсутствие роста культуры из перевиваемой высокодифференцированной АКМЖ. Тогда как ИК из низкодифференцированной АКМЖ формировали трехкомпонентную структуру, состоящую из 1А - адгезионного слоя клеток MM ряда, формирующего подложку; 2А-адгезионного слоя эпителиальных клеток АКМЖ; 3С-суспензионного слоя, представленного сфероидоподобными образованиями различной формы (составлены из мелких клеток размером 50-70 мкм). При пересеве клеток 3С-слоя ИК *in vitro* в течение месяца получали вновь трехкомпонентную культуру, аналогичную исходной. Подкожная перевивка 3С-слоя сингенной мыши в те же сроки приводила к появлению *in vivo* АКМЖ, патоморфологически аналогичной изначальной опухоли. 2. Культивирование *in vitro* ИК из спонтанных низкодифференцированных АКМЖ от мышей высокоракковых линий также приводило к росту трехслойных культур с аналогичными свойствами.

Выводы. Полученные результаты наводят на мысль, что в суспензионном слое ИК из клеток низкодифференцированных АКМЖ могли находиться стволовые клетки опухоли, по крайней мере, в течение первого месяца культивирования.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ ПИЩЕВОДА КРЫС

Накохов Р.З.¹, Куевда Е.В.¹, Сотниченко А.С.¹, Гуменюк И.С.¹, Гилевич И.В.¹, Каде А.Х.¹, Могильная Г.М.¹, Губарева Е.А.¹

1. Кубанский государственный медицинский университет,
Краснодар, Россия.
nrz00009@gmail.com

Децеллюляризация - процесс, направленный на удаление клеток с сохранением компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и трехмерной структуры органа или ткани. ВКМ обладает свойствами поддерживать клеточную адгезию, регулировать миграцию, рост, дифференцировку клеток, апоптоз, модулировать действие цитокинов и факторов роста, активировать межклеточное взаимодействие. Таким образом, для создания полноценной тканеинженерной конструкции (ТИК) органа или ткани необходимо получение качественного биологического каркаса.

Материалы и методы. В работе использовали 15 взрослых крыс-самцов линии Wistar весом 230±35 г. (по 5 особей для отработки каждого из вариантов протоколов, 5 крыс составили группу нативного контроля). Децеллюляризацию пищевода выполняли оригинальным и авторским модифицированным перфузионным детергент-энзиматическим методом с использованием дезоксихолата натрия и ДНКазы. При оптимизации протокола нами осуществлен ряд модификаций с изменением последовательности и длительности воздействия децеллюляризирующих растворов, а также снижением скорости их перфузии до 6 мл/мин. Оценку качества получаемого матрикса проводили рутинными гистологическими методами.

Результаты исследования. Окрашивание гематоксилином и эозином, а также флуорофором DAPI не выявило наличия ядер и клеточных элементов в децеллюляризированных тканях пищевода при сохранности архитектоники.

В контрольной группе площадь просвета нативного пищевода составила 1,019±0,043 мм²; при использовании оригинального протокола децеллюляризации - 5,716±0,256 мм², модифицированного - 2,401±0,037 мм².

Результатом модификации протокола стало менее выраженное растяжение и снижение эластичности органа, что позволило разработать протокол с возможностью решения одной из ключевых проблем тканевой инженерии пищевода - сохранения биомеханических свойств каркаса, так как будущий имплантат должен спадаться в состоянии покоя и при этом быть эластичным для обеспечения прохождения пищевого комка.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРНЫХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ И ЗАДАЧ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Нащекина Ю.А.^{1*}, Юдинцева Н.М.¹, Никонов П.О.¹, Каширова А.О.¹, Веселова Т.В.¹, Муравьев А.Н.¹, Воронкина И.В.¹, Смагина Л.В.¹, Александрова С.А.¹, Блинова М.И.¹

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
ulychka@mail.ru

В настоящее время клеточные технологии находят широкое применение в регенеративной медицине при различных заболеваниях и повреждениях органов и тканей. Введённые в организм пациента клетки способствуют восстановлению повреждённых тканей. Однако для трансплантации клеток на рану их необходимо обработать протеолитическими ферментами для отделения от поверхности культурального сосуда, что существенно снижает их функциональную активность, а, следовательно, и эффективность восстановления повреждений. Кроме того, невозможность локализовать суспензию в ране и, в связи с этим, контролировать количество клеток в зоне повреждения, снижает скорость восстановления повреждений. Решением этих проблем может быть трансплантация клеток вместе с биodeградируемой подложкой, или скаффолдом, которая в процессе регенерации ткани резорбирует на нетоксичные продукты. Культивирование и трансплантация клеток вместе с биodeградируемым носителем является целью междисциплинарного направления науки – тканевой инженерии.

В зависимости от типа повреждённой ткани – кожа, кость, хрящ или мочевого пузыря были сформированы биodeградируемые полилактидные носители в виде плёнок или трёхмерных пористых скаффолдов различной архитектуры. Для восстановления каждого типа ткани использовали специфические для них клетки – кератиноциты, фибробласты, хондроциты или мезенхимные стромальные клетки. Изучали скорость резорбции скаффолдов *in vivo*. Показано, что полилактидный скаффолд и продукты его деградации не оказывают токсического влияния на окружающие ткани. В зависимости от типа клеток и ткани использовали различные модификации полимерных скаффолдов. Модификация скаффолдов коллагеном увеличивает количество адгезировавших клеток и скорость их пролиферации. Скорость и эффективность восстановления ткани выше после трансплантации клеток вместе со скаффолдами по сравнению с трансплантацией клеток в виде суспензии или без клеток и скаффолдов.

Работа выполнена на средства гранта РФ №14-50-00068.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ВЫДЕЛЕНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРОВ КОСТНОГО МОЗГА

Немков А.С.¹, Бабенко Е.В.¹, Буненков Н.С.¹, Белый С.А.¹, Рощина О.С.¹

ПСПБГМУ им. акад. И.П.Павлова, Россия.

Применение клеточной терапии как базового метода регенерации тканей и органов-многообещающая идея. Клинические испытания внутрикостного использования аутологичных клеток костного мозга для лечения больных с неоперабельными формами поражения коронарных артерий проведены в многих странах, выявили отчетливо положительный эффект и умеренный по выраженности. В большинстве исследований в качестве метода выделения мононуклеарной фракции костного мозга применяли препарат фиколл. Реже использовали гидроксиэтилкрахмал. В единичных исследованиях применяли аппаратный метод - Sepax (BioSafe).

Цель нашего исследования - оценить влияние различных методов выделения аутологичных мононуклеарных клеток костного мозга на количество, жизнеспособность и функциональную активность полученного клеточного материала. Костный мозг (140 мл) со стабилизатором (70 мл физиологического раствора с гепарином 25-30 ед на 1 мл) Общее количество костного мозга, получаемое для исследования составило 210 мл вместе со стабилизатором (гепарин). Полученный объем делили на 3 равные части по 70 мл. Выделение клеток начиналось не позднее 30 минут после их получения (в среднем через 15 минут). Использовались 3 метода выделения: с помощью центрифугирования на фиколле (Ficoll), на гидроксиэтилкрахмале (HES) - ручной способ и на аппарате Sepax. Жизнеспособность оценивали с помощью окраски 7AAD, по общей клеточности взвеси и концентрации CD34+, CD133+ (определено с помощью проточной цитометрии). Функциональную активность оценивали при посеве на метил целлюлозе через 2 недели.

Результаты.

Общая клеточность, концентрации CD34+, CD133+ были выше, а гибель клеток меньше при выделении клеток на аппарате Sepax и ручным способом (HES). Количество колониеобразующих единиц при посеве на метил-целлюлозе также было больше при выделении клеток на аппарате Sepax и ручным способом (HES). При выделении с помощью фиколла отмечена значительная потеря стволовых клеток с маркером CD34+, снижение их жизнеспособности и репродуктивной активности.

Выводы:

Оптимальным способом выделения мононуклеарной фракции костного мозга является аппаратный способ Sepax.

2. Ручной способ центрифугирования на гидроксиэтилкрахмале приближается по показателям к аппаратному методу Serax, но стабильность результатов зависит от «человеческого» фактора.

3. При использовании фиколла имеется значительная потеря стволовых клеток, снижение их репродуктивной активности, однако этот способ обеспечивает минимальную примесь эритроцитов и может быть использован для интрамиокардиального введения.

РОЛЬ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВОЙ НИШИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Полетика В.С.¹, Савельева О.Е.², Таширева Л.А.², Кайгородова Е.В.², Перельмутер В.М.²

1. СибГМУ.
2. НИИ онкологии Томского НИМЦ, Томск, Россия.
vpoletika@yandex.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) являются важной составляющей стромы опухоли [Barcellos-Hoff M.H. et al., 2013]. Механизмы, лежащие в основе проопухолевой активности МСК, включают стимулирование неоангиогенеза, увеличение инвазивного и метастатического потенциала раковых клеток [Chang A.I. et al., 2015]. В то же время, роль МСК в формировании опухолевой ниши, способствующей росту и прогрессии опухоли, изучена недостаточно. Это определило цель настоящей работы: изучить взаимосвязь уровня МСК у больных раком молочной железы с параметрами, характеризующими прогрессию опухоли (размер опухоли, плотность сосудов в опухоли, степень фиброза, наличие лимфогенных метастазов).

В исследовании участвовали 16 больных с впервые диагностированным раком молочной железы (от 29 до 70 лет). Критерии включения в исследование: морфологически верифицированная инвазивная карцинома молочной железы неспецифического типа, сохранная менструальная функция, общее состояние по шкале ECOG от 2 баллов и отсутствие хронических воспалительных заболеваний в стадии обострения. Использовали операционный опухолевый материал, из которого методом дезагрегации готовили клеточную суспензию. Содержание CD34-CD90+CD45- МСК оценивали методом проточной цитометрии. Степень фиброза в опухоли оценивали морфологически, плотность сосудов определяли иммуногистохимически с помощью анти-CD31 антител. Результаты исследования анализировали с использованием критериев Шапиро-Уилка и коэффициента ранговой корреляции Пирсона.

Выявлена прямая корреляционная связь между содержанием МСК и плотностью сосудов в опухоли ($p < 0,05$), что согласуется с данными об ангиогенез-стимулирующем действии этих клеток [Chang A.I. et al., 2015]. Также установлена обратная корреляционная связь между уровнем МСК и степенью фиброза в опухоли ($p < 0,01$), что может быть связано с их способностью подавлять активность иммунных клеток, участвующих в фибротическом процессе. Связи количества МСК с размером опухоли и наличием лимфогенных метастазов обнаружено не было.

ПРОДУКЦИЯ РАСТВОРИМЫХ ФАКТОРОВ В СМЕШАННЫХ КУЛЬТУРАХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ЛИМФОЦИТОВ

Полтавцев А.М.¹, Полтавцева Р.А.², Юшина М.Н.², Свирщевская Е.В.¹

1. Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия.
2. ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова» Минздрава России, Москва, Россия.
andreympoltavtsev@gmail.com

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) имеют ряд свойств, которые можно использовать для терапии. При трансплантации аутологичным или аллогенным реципиентам, МСК подавляют пролиферацию лимфоцитов, что предполагается использовать для терапии аутоиммунных заболеваний. Механизм иммуносупрессии остается спорным. Одним из возможных механизмов является синтез и секреция противовоспалительных цитокинов.

В данной работе проведен анализ продукции 19 растворимых факторов (цитокинов, хемокинов, молекул адгезии) в смешанных культурах МСК, полученных из Вартонова студня, и лимфоцитов периферической крови (ЛПК), полученных от гетерологичных доноров. Для постановки культур использовали ЛПК, стимулированные митогеном ФГА и нестимулированные. МСК помещали в планшеты и культивировали до достижения адгезии. ЛПК активировали ФГА, затем митоген отмывали. Супернатанты собирали на 1, 2, 4 и 6 сутки. Анализ концентрации цитокинов проводили методом цитометрических бус с иммобилизованными антителами к цитокинам. Концентрацию определяли по сравнению с титровочными кривыми стандартов цитокинов с известной концентрацией.

МСК спонтанно продуцировали хемокины ИЛ-8, MCP1 и цитокин ИЛ-6, также продуцировали ИФН- γ и ИЛ-10. В смешанных культурах максимальная продукция наблюдалась на 48 ч. Супрессорное действие ИФН- γ опосредовано продукцией индоламин-2,3-диоксигеназы, необходимой Т-клеткам при делении. ИЛ-10 подавляет синтез всех факторов, что связано с контролем локальных иммунных ответов.

Таким образом, показали, что имеются мастер-цитокины, продукция которых значительно (в 6-9 раз) усиливается в смешанных культурах МСК-ЛПК. Механизмы иммуносупрессорного действия различаются при взаимодействии с митоген-активированными и неактивированными ЛПК. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-25-00179).

ВЛИЯНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В СМЕШАННЫХ И МЕМБРАН-РАЗДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУРАХ

Полтавцева Р.А.¹, Полтавцев А.М.², Юшина М.Н.¹, Свирщевская Е.В.²

1. Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И.Кулакова, Москва, Россия.
2. Институт биорганической химии РАН, Москва, Россия.
rimpol@mail.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) являются мультипотентными клетками, способными дифференцироваться в различные популяции клеток. В последние годы было показано, что МСК оказывают иммуносупрессорное действие и могут использоваться для лечения аутоиммунных и аллергических заболеваний. При этом МСК оказывают иммуносупрессорное действие как в аутологичных, так и в аллогенных культурах. В целом, все гетерологичные клетки полностью отторгаются иммунной системой реципиента. Однако процесс отторжения требует времени, за которое может быть достигнут терапевтический эффект.

В данной работе изучали эффект МСК, полученных из Вартонова студня, на пролиферацию активированных митогеном ФГА гетерологичных лимфоцитов в смешанных и разделенных, проницаемой для растворимых веществ мембраной, культурах. МСК помещали в планшеты, культивировали до достижения адгезии. ЛПК окрашивали витальным красителем CFSE, активировали ФГА в течение ночи, после чего митоген отмывали. МСК и ЛПК смешивали в разных соотношениях. Смешанные и Transwell культуры инкубировали в течение 6 суток. Анализ фракции пролиферирующих ЛПК проводили методом проточной цитометрии с использованием антител к CD4, CD8, CD16 и CD56 маркерам Т- и НК-клеток. Показали, что подавление пролиферации носит дозозависимый характер и повышается со снижением соотношения ЛПК/МСК. Основным механизмом подавления пролиферации был связан с торможением деления клеток, начиная с 3-его цикла деления. Так, в контроле регистрировали 6 циклов деления, а в смешанных культурах-3-4. Различия в Transwell культурах по количеству циклов деления не было. Пролиферация в Transwell культурах также подавлялась значительно меньше, наблюдалась преимущественно в популяции CD4+ Т-клеток и только при большом количестве ЛПК (ЛПК/МСК>20). Таким образом, показано, что основным механизмом подавления пролиферации связан с контактным взаимодействием МСК и ЛПК. Работа проведена при поддержке Российского научного фонда (грант № 14-25-00179).

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОДЕГРАДИРУЕМОЙ МАТРИЦЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО СОСУДИСТОГО ИМПЛАНТАТА В ДЛИТЕЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Попов Г.И.¹, Попрядухин П.В.², Вавилов В.Н.¹, Добровольская И.П.², Юдин В.Е.², Юкина Г.Ю.¹

1. Первый Санкт-Петербургский медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург, Россия.
2. Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, Россия.
trek-4300@yandex.ru

Цель исследования заключалась в комплексной оценке биорезорбируемой матрицы из L-полилактида (ПЛА) и определении ее эффективности в длительном хроническом эксперименте.

Методом электроформования (Nanon 01A) получены трубчатые графты (внутренний диаметр 1,1 мм) на основе нетканого материала из нановолокон ПЛА, размер пор 10-30 мкм. Изучены механические характеристики образцов полученных графтов и их барьерные свойства. Определены такие показатели как модуль упругости, прочность на разрыв, разрывная деформация (Instron 5943). Исследование адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК), полученных из жировой ткани крысы, позволило оценить совместимость синтетического материала на основе нановолокон с клеточной культурой. Полученные графты имплантировали в качестве линейных протезов в брюшную аорту крыс (n=18). Полученный материал подвергался гистологическому исследованию, выполнялась электронная микроскопия, иммуногистохимическое исследование (CD31+).

При использовании метода электроплетения для создания трубчатых графтов высокой пористости из L-полилактида не наблюдается значимого снижения механических свойств. Показано, что МСК активно пролиферируют на графтах из полилактида. При электронной микроскопии эксплантатов первые признаки биодеградации волокон полимера отмечены через 1 месяц. Тогда же окончательно формируется эндотелиальная выстилка (CD31+) и субэндотелиальный слой на всем протяжении графтов, начинается врастание соединительной ткани в толщу стенки протеза. В сроки 1-14 месяцев происходит проградия биодegradация волокон полимера, стенка имплантата замещается соединительной тканью. Через 14 месяцев стенка протеза представлена соединительной тканью с импрегнированными в нее элементами волокон полимера, на

внутренней поверхности располагается неоинтима, представленная эндотелиальными клетками и субэндотелиальным слоем, образованным в свою очередь коллагеновыми и эластиновыми волокнами. При ангиографии протез свободно проходим, признаков его стенозирования или дилатации нет. Через 16 месяцев (n=3) происходит тотальная биорезорбция полимера, в результате стенка образованного «сосуда» состоит из соединительной ткани, развивается аневризма всей зоны реконструкции. Проходимость графтов составила 88 %.

Полученная методом электроплетения матрица из биоразлагаемого полимера обладает достаточными физико-механическими свойствами для имплантации в сосудистое русло. В опытах *in vivo* доказана ее безопасность, биосовместимость. Низкие механические свойства соединительной ткани, образовавшейся на основе матрицы из биodeградируемого полимера, являются причиной образования аневризмы зоны реконструкции, что свидетельствует о необходимости предварительного культивирования клеточного материала *in vitro*.

ЭКСПРЕССИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С ЯДРОСОДЕРЖАЩИМИ КЛЕТКАМИ ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Романов Ю.А.^{1,3}, Балашова Е.Е.³, Волгина Н.Е.², Кабаева Н.В.¹, Дугина Т.Н.³

1. Российский кардиологический научно-производственный комплекс, Москва, Россия.
2. Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И.Кулакова, Москва, Россия.
3. Банк пуповинной крови «КриоЦентр», Москва, Россия.
romanov@cryocenter.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) способны взаимодействовать с различными популяциями клеток крови, проявляя иммуномодулирующие и противовоспалительные свойства. Однако, о способности МСК активироваться или ингибироваться при подобном контакте известно мало. В данной работе исследованы особенности экспрессии поверхностных молекул МСК ткани пупочного канатика (МСК-ТПК) и костного мозга (МСК-КМ) человека при со-культивировании с ядро-содержащими клетками пуповинной крови (ЯСК-ПК).

МСК культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Фракцию ЯСК-ПК добавляли к монослою МСК в концентрации около 5×10^6 клеток/мл. Через 48 часов, 1 и 2 недели со-культивирования культуры трипсинизировали и инкубировали с фикоэритрин- или ФИТЦ-конъюгированными антителами к CD13, CD29, CD40, CD44, CD54, CD71, CD73, CD80, CD86, CD90, CD105, CD106, CD146, HLA-ABC, HLA-DR. Для исключения из анализа ЯСК-ПК и их агрегатов с МСК в каждую пробу добавляли антитела к CD45.

Контрольные культуры МСК интенсивно окрашивались на CD13, CD29, CD44, CD54, CD71, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-ABC, слабо/умеренно экспрессировали CD106 и не несли на поверхности CD45, CD80 и CD86. При со-культивировании изменения в экспрессии большинства маркеров МСК можно было охарактеризовать, как незначительные. В случае CD13, CD29, CD40, CD44, CD73, HLA-DR не было выявлено никаких изменений. В других (CD71, CD80, CD86, CD90, CD105, CD146, HLA-ABC), - наблюдались умеренные сдвиги пиков флуоресценции без изменения доли положительно окрашенных клеток. Единственные достоверные различия были выявлены в отношении молекул клеточной адгезии, ответственных за осуществление непосредственных межклеточных кон-

тактов с лейкоцитами - CD54 (ICAM-1) и CD106 (VCAM-1), и то только в случае МСК, выделенных из костного мозга.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 14-25-00179).

РЕЦЕПТОР ЭФР В МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ

Салова А.В.¹, Леонтьева Е.А., Корнилова Е.С., Беляева Т.Н.

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия. *avsalova @gmail.com*

Стволовые клетки экспрессируют целый ряд рецепторов к ростовым факторам, таким как ЭФР, факторы роста фибробластов, и ряд других. Однако в настоящее время основная масса данных посвящена скорее феноменологии эффекта ростовых факторов на уровне подбора комбинаций различных стимулов, тогда как изучение на клеточном и молекулярном уровне процессов, инициируемых этими факторами, находится на начальной стадии. В частности, механизмы реализации эффектов ростовых факторов и внутриклеточная судьба их комплексов с соответствующими рецепторами в стволовых клетках практически не исследуются. В качестве модели для изучения рецептор-опосредованного эндоцитоза в стволовых клетках была выбрана система «ЭФР-рецептор».

В качестве объекта использовались культивируемые мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека из десквамированного эндометрия менструальной крови. Анализ рецептор-опосредованного эндоцитоза в МСК проводился методом конфокальной микроскопии как на фиксированных препаратах с выявлением рецептора ЭФР и белков, характерных для определенных стадий эндоцитоза, так и на живых клетках при стимуляции эндоцитоза ЭФР, меченным с помощью флуорофора Су3 (ЭФР-Су3).

После стимуляции эндоцитоза добавлением ЭФР в МСК было обнаружено, что рецептор-содержащие везикулы перемещались с определенной динамикой от периферии к центру клетки. Динамика ассоциации этих везикул с маркером ранних эндосом ЕЕА1 согласуется с общепринятой моделью эндоцитоза рецептора ЭФР. Необходимо отметить, что рецептор выявлялся не только в виде везикул, но и в виде фибриллярных структур, распределенных во всем объеме клетки и колокализующихся с актиновыми филаментами. Если запуск эндоцитоза осуществлялся ЭФР-Су3, выявляющим только непосредственно участвующий в стимулированном эндоцитозе рецептор, то в клетках обнаруживались лишь везикулярные структуры. Дальнейшее исследование эндоцитоза рецептора ЭФР позволит расширить представления о его функциональной роли в МСК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-50-00068).

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ НИШИ ПРИ ХЛЛ

Семенова Н.Ю.¹, Бессмельцев С.С.¹, Ругаль В.И.¹

1. ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия.

nataliasemenovalab@gmail.com

Краткое вступление. Эндостально-васкулярные структуры стромы костного мозга, формирующие гемopoэтическую нишу, регулируют развитие гемopoэтических стволовых клеток и их лимфоидную дифференцировку.

Цель работы. Определить морфофункциональные особенности стромальных элементов кроветворного микроокружения, участвующих в формировании гемopoэтической ниши при ХЛЛ.

Материалы и методы. Исследованы полученные до начала терапии трепанобиоптаты подвздошной кости 96 больных ХЛЛ в возрасте 49-73 лет. Использовались гистологические, гистохимические, иммуногистохимические (ИГХ) и морфометрические методы исследования (VideoTest®).

Результаты и обсуждение. У больных ХЛЛ в паренхиме костного мозга было выделено три типа лимфоидной инфильтрации: нодулярный (18,8%), интерстициальный (27%), диффузный (54,2%).

ИГХ исследования с антителами CD31, CD34, Anti-collagen IV показали, что очевидные перестройки микроциркуляции отмечались при интерстициальной и особенно диффузной инфильтрации. Оба варианта сопровождалась изменением структуры интратрабекулярного коллагена эндостальных зон и усилением плотности микрососудов.

Анализ эндостальных зон губчатой кости показал увеличение количества клеток на единицу площади при интерстициальной ($1,8 \pm 0,4$ против $1,4 \pm 0,2$ в группе сравнения) и диффузной ($2,3 \pm 0,7$) инфильтрации. Установлено изменение морфологии клеток. Количество клеточных элементов с вытянутыми уплощенными формами ядер уменьшалось, наблюдалось нарастание в эндостальных и субэндостальных зонах стромальных клеток с крупными просветленными ядрами. Экспрессия молекулы CD146, которая маркирует стромальные клетки эндостальных и периваскулярных зон при диффузной инфильтрации также увеличена ($10,2 \pm 1,3\%$ против $2,5 \pm 0,3\%$ в контрольной группе).

Площадь сосудов при диффузной инфильтрации ($17,9 \pm 3,7\%$) возросла почти в 2 раза по сравнению с контролем ($9,1 \pm 1,2\%$), при интерстициальной увеличилась почти в 1,5 раза ($13,1 \pm 1,2\%$), при нодулярной

инфильтрации статистически значимых изменений не обнаружено ($12,3 \pm 2,5\%$).

Заключение. Отмеченные изменения стромальных нишеобразующих структур костного мозга способны приводить к нарушению развития ГСК и быть одним из патогенетических факторов малигнизации лимфопоэза.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТАВА И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ (ЛТ) ЧЕЛОВЕКА КАК РОСТОВОЙ ДОБАВКИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ КЛЕТОК, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ/ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Сергеева Н.С.¹, Шанский Я.Д.¹, Свиридова И.К.¹, Кирсанова В.А.¹, Ахмедова С.А., Каралкин П.А.¹

1. Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, Москва, Россия. *prognoz.06@mail.ru*

Клиническое использование клеточной терапии/тканевой инженерии требует безопасной технологии культивирования клеток и, в частности, исключения их контакта с ксеногенными биопрепаратами, к которым относится и традиционно используемая эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС). ЛТ позиционируется как альтернативный ЭТС источник факторов роста (ФР) для культивирования клеток.

Цель исследования: охарактеризовать качественный и количественный состав ЛТ в сравнительном аспекте с ЭТС, разработать технологию его получения и принципы стандартизации.

Материалы и методы. Источником ЛТ была тромбоцитарная масса (ТМ) 193 доноров. Биохимический анализ ЛТ, содержание гормонов и ФР осуществляли с помощью коммерческих тест-систем. В работе использовали ММСК из жировой ткани человека, фибробласты человека (ФЧ, штамм 1608 hTERT) и линии опухолевых клеток (HeLa, MG-63, HT-29, HCT-116). Динамику клеточных популяций оценивали с помощью МТТ-теста, влияние ЛТ на структуру ДНК- методом ДНК-комет, на метаболическую кооперацию клеток- по целостности межклеточных контактов (последние два метода - совместно с Институтом канцерогенеза РОНЦ МЗ РФ). Кроме того, исследовали индуцированную *in vitro* дифференцировку ММСК и их миграционную активность в присутствии ЛТ.

Результаты. Разработана технология получения ЛТ из ТМ. Показатели белкового и липидного обмена, половых гормонов и инсулина в ЛТ были достоверно выше, а показатели минерального обмена - ниже, чем в ЭТС. Концентрации ФР (PDGF, IGF, VEGF, TGF- β 1, FGFb) в ЛТ в 10-100 раз превосходили таковые в ЭТС, однако концентрации ЛТ, поддерживающие пролиферацию и/или дифференцировку клеток *in vitro* оказались сходными - 5-10%. ЛТ активнее, чем ЭТС, стимулировал миграцию ММСК в трансвеллах. ЛТ и ЭТС не вызывали нарушения целостности ДНК, но до-

зависимо несколько снижали межклеточную кооперацию. Установлены значимые различия в термочувствительности ЛТ и ЭТС как ростовых добавок. Полученные данные свидетельствуют о том, что принципиально разные коктейли биологически активных веществ в ЛТ и ЭТС ответственны за их функциональные свойства. На основе математических расчетов разработан (в плане стандартизации биомедицинского продукта) принцип пулирования ЛТ.

Работа поддержана Минобрнауки России, соглашение №16.610.21.0001, ID RFMEF161014X0001.

ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ ДЕТСКОГО ЦЕРЕБРАЛЬНОГО ПАРАЛИЧА

Сечкина Г.В.¹, Ступникова Т.В.¹, Кузьменко В.В.^{1,2}, Армянинова Д.К.^{1,2},
Вавилова Л.М.¹

1. ООО «Новейшая медицина», клиника стволовых клеток, Москва, Россия.
2. Институт Биохимической Технологии и Нанотехнологии Российского Университета Дружбы Народов, Москва, Россия.
doctor@stvolkletki.ru

Детский церебральный паралич (ДЦП) относится к группе неврологических заболеваний, в основе которых лежит недоразвитие головного мозга и/или повреждение последнего во время беременности или родов. Традиционные методы лечения часто оказываются малоэффективными, остаточный неврологический дефицит значительно снижает качество жизни детей.

Клеточная терапия представляет собой новый перспективный метод лечения ДЦП. Положительное действие мезенхимальных стволовых клеток (МСК) обусловлено их выраженной нейропротективной активностью (продукцией нейротрофического фактора), стимуляцией эндогенного нейрогенеза, ангиогенеза и синаптогенеза.

В клинике стволовых клеток «Новейшая медицина» под наблюдением в настоящее время находятся пять детей с диагнозом ДЦП в возрасте от 1 до 14 лет. Каждому пациенту внутривенно было введено 2 млн МСК на 1 кг веса (дважды с интервалом 2 месяца). Всем пациентам проводилась лечебная гимнастика и массаж после каждого введения МСК. У двух пациентов после первого введения МСК был отмечен подъем температуры тела до субфебрильных значений (37,2-37,4°C), которая нормализовалась в этот же день. В дальнейшем за весь период наблюдения побочных эффектов, ассоциированных с клеточной терапией, отмечено не было. После первого введения МСК у двух пациентов с тяжелой формой ДЦП наблюдалось значительное снижение гипертонуса мышц и улучшение произвольных движений конечностей, дети начали держать голову, переворачиваться. Через 1 месяц после второго введения МСК, у одного пациента произошла инициация первых шагов. Важно отметить, что у всех детей в разной степени выраженности наблюдалось улучшение когнитивных функций: появление речи (у детей, не разговаривавших ранее), повышение концентрации внимания, улучшение памяти. Таким образом, полученные результаты демонстрируют большую перспективность применения клеточной терапии в лечении ДЦП.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ЯИЧНИКОВОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, ВЫЗВАННОЙ ХИМИОТЕРАПИЕЙ

Скибина К.П.¹, Козуб Н.И.², Прокопюк В.Ю.³

1. Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина.
2. Харьковская медицинская академия последипломного образования, Харьков, Украина.
3. Институт криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина.
forskina@gmail.com

Введение: Одним из последствий химиотерапии (ХТ) и лучевой терапии является развитие преждевременной недостаточности яичников (ПНЯ), которая длится от нескольких месяцев до 3 лет у женщин до 35 лет и считается необратимой у пациенток старше 40 лет (Е. Б. Троицкий соавт., 2012). Поиск новых методов реабилитации женщин, перенесших химиотерапию, является актуальной задачей (Meattini I. et al, 2016).

Цель работы: сравнение терапевтических эффектов криоэкстракта плаценты (КП), эксплантов плаценты (ЭП) и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани (МСКЖТ) для восстановления функции яичников у животных с ПНЯ после ХТ в эксперименте.

Материалы и методы: ПНЯ моделировали на самках мышей линии BALB/c по методу Guan-Yu X. et al, 2014, введением бусульфана и циклофосфамида. Использовали 5 групп по 10 самок весом 20,1 ± 1,1 г с регулярным эстральным циклом: I — контрольная группа, II — группа с моделью ПНЯ, III — группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение КП (по 0,01 г в/м 1 р/сут 5 дней). IV- группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение ЭП (10 мг в/м однократно). V-группа с моделью ПНЯ, получавшая лечение МСКЖТ (100000 клеток внутрибрюшинно однократно). Исследовали вес, активность, эстральный цикл, половую активность.

Результаты исследования: После ХТ у всех животных достоверно снижался вес, эстральный цикл становился монофазным, вагинальных пробок не было. Во II группе животных без лечения вес и активность восстанавливались через 6 недель после ХТ, эстральный цикл через 5 недель у 40% и через 7 недель у 70%, половая активность — через 7 недель. В III группе животных, после применения КП, вес и активность восстанавливались через 4 недели, эстральный цикл у 60% — через 3 недели, через 5 — у 100%, половая активность — через 5 недель. В IV группе животных, после применения ЭП, вес и активность восстанавливались

через 3 недели, эстральный цикл у 60% — через 3 недели, через 5 — у 100%, половая активность — через 5 недель. В V группе животных, после применения МСКЖТ, вес и активность восстанавливались через 3 недели, эстральный цикл у 60% — через 3 недели, через 5 — у 100%, половая активность — через 5 недель.

Выводы: В эксперименте КП, ЭП и МСКЖТ оказывает выраженный терапевтический эффект при индуцированном ХТПНЯ. Предполагается дальнейшее исследование механизмов воздействия МСКЖТ, путем их паравариального введения, на восстановление функции яичников у животных с ПНЯ с использованием зеленого флуоресцентного протеина как маркера для определения нахождения МСКЖТ в тканях и органах.

ДИФФЕРЕНЦИРОВКА МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ И ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

Смагина Л.В.¹, Воронки на И.В.¹, Крылова Т.А.¹, Мусорина А.С.¹, Полянская Г.Г.¹

1. Лаборатория биологии клетки в культуре, ФГБУН ИНЦ РАН,
Санкт-Петербург, Россия.

voronirina@list.ru

Линии мезенхимных стволовых клеток (МСК), выделенных из костного мозга (FetMSC), зачатка конечности (M-FetMSC) раннего эмбриона человека, и полученных из них клеточных сфероидов, способны дифференцироваться в адипогенном и остеогенном направлениях. Анализ активностей ММП-9, 2, 1 в процессе дифференцировок показал межлинейные различия и различия между монослойными культурами (2D) и клеточными сфероидами (3D). Установлена корреляция между уровнем адипогенной дифференцировки и уровнем активности ММП-9 и 2 в обеих линиях при 2D и 3D культивировании. Низкий уровень адипогенной дифференцировки в линии M-FetMSC (2D) соответствует сниженной активности ММП-2, а повышение уровня дифференцировки (3D) приводит к значительному повышению ММП-2. Наоборот, низкий уровень адипогенной дифференцировки в линии M-FetMSC (2D) соответствует повышенной активности ММП-1, а увеличение уровня адипогенной дифференцировки (3D) приводит к снижению ММП-1. В отличие от адипогенной дифференцировки, динамика активностей ММП-9,1 не коррелирует с уровнем остеогенной дифференцировки. Постоянный уровень активности ММП-2 при остеогенной индукции совпадает с уровнем остеогенной дифференцировки. Результаты позволяют предположить, что ММП как положительно, так и отрицательно влияют на дифференцировку МСК. Динамика активности ММП-9 и -2 отражает взаимодействие клеток и индукционной среды, включающей сыворотку, содержащую ММП. Наибольшие отличия между вариантами дифференцировки наблюдали для ММП-1, практически отсутствующей в индукционной среде. Полученные различия по активности ММП могут быть связаны с различными свойствами МСК в 2D и 3D культурах.

Работа была поддержана грантом РФФИ №14-50-00068.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ХОЛОДНОЙ ПЛАЗМЫ АТМОСФЕРНОГО ДАВЛЕНИЯ НА МЕХАНИЗМЫ ТКАНЕВОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ IN VITRO И IN VIVO

Смирнова Н.В.^{1,2}, Шемет М.В.³, Петрова Н.О.⁴, Крюков А.Е.⁵

1. Лаборатория «Полимерные материалы для тканевой инженерии и трансплантологии», Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.
2. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
3. Кафедра «Техника высоких напряжений, электроизоляционная и кабельная техника», Институт энергетики и транспортных систем, Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.
4. Биотехнологическая компания «Биокад», Санкт-Петербург, Россия.
5. Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия.

nvsmirnoff@yandex.ru

В результате исследований, проводимых последние два десятилетия, удалось генерировать холодную плазму при атмосферном давлении (CAP - cold atmospheric plasma). Были разработаны источники CAP с хорошо контролируемой температурой, ниже 40 ° С, что позволило безопасно воздействовать плазмой на живые клетки и ткани. В основе новых направлений - плазменной биологии и медицины лежит возможность использовать эффекты CAP путем регулирования характера взаимодействий между компонентами плазмы со специфическими структурными элементами и функциями живых клеток.

С использованием оригинальной установки, генерирующей холодную плазму атмосферного давления, осуществляли опосредованное воздействие на культуру фибробластов человека. С помощью МТТ-теста было установлено, что пролиферативная активность фибробластов, подвергшихся воздействию, возросла на 40 % по сравнению с контрольными клетками. С помощью маркера генотоксических повреждений - гамма-модификации гистона H2AX было показано, что подвергшиеся плазмохимическому воздействию клетки не демонстрировали повреждений ДНК выше фонового уровня. Кроме того, при исследовании уровня ассоциированной со старением β-галактозидазы экспериментальная культура демонстрировала более низкую концентрацию этого маркера, чем в контроле.

При исследованиях in vivo моделированные скальпированные раны на спине крыс линии Вистар в экспериментальной группе были однократно обработаны (поверхностно и путем подкожных инъекций по границе раны)

физиологическим раствором, подвергшимся плазмохимиической экспозиции. В опытной группе было показано существенное снижение гнойных осложнений, более быстрые темпы регенерации. Данные гистологического анализа свидетельствуют о снижении раневой инфильтрации и объема рубцовой ткани у животных после экспериментального воздействия.

Исследованиями последних лет показано, что CAP обладает мощным антимикробным, гемостатическим, противоопухолевым действием. Кроме того, была выявлена способность CAP дозозависимым образом влиять на метаболизм клеток. In vivo этот эффект реализуется в виде стимуляции тканевой регенерации.

Авторы благодарят Российский научный фонд грант № 14-33-00003 за финансовую поддержку в проведении исследований.

ПОДКОЖНАЯ ИМПЛАНТАЦИЯ КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СВОЙСТВ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО МАТРИКСА СЕРДЦА

Сотниченко А.С.¹, Накохов Р.З.¹, Кувейда Е.В.¹, Гуменюк И.С.¹, Гилевич И.В.¹, Губарева Е.А.¹

1. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет»
Минздрава России, Краснодар, Россия.
alex24.88@mail.ru

В настоящее время существенно возросло количество работ, посвященных децеллюляризации органов и тканей. Одним из критериев качества децеллюляризации, подтверждающим отсутствие иммуногенности получаемых каркасов, является подкожная имплантация. Данный метод помогает определить эффективность удаления клеточно-ассоциированных белков и их *in vivo* воздействие на ткани.

Материалы и методы. Работа выполнена на 12 крысах - самцах линии Wistar при соблюдении надлежащих этических норм. Децеллюляризацию сердца выполняли модифицированным детергент-энзиматическим методом с использованием дезоксихолата натрия и ДНКазы. Образцы тканей левого желудочка нативных и ацеллюлярных сердец размером 1 см имплантировали крысам подкожно в области спины при общей анестезии 5 ЕД2% Xylazin (Intervet, Netherlands), 3 ЕД Zoletil 100 (Virbac, France) и 5 ЕД 0.1% Atropine Sulfate (LTDOZGSCDC, Kharkov, Ukraine). Контролем служили ложнопериорированные животные. На 21 сутки образцы эксплантировали и проводили морфологический анализ с применением как рутинных методик, так и иммуногистохимического окрашивания.

Результаты исследования. Имплантация нативного сердца приводила к развитию выраженной воспалительной реакции в месте оперативного вмешательства. Графт на 21 сутки был полностью некротизирован и окружен плотной фиброзной капсулой с небольшим количеством сосудов. В инфильтрате присутствовало большое количество клеток лимфоцитарно-макрофагального ряда (положительная реакция с антителами к рецепторам CD3 и CD68). При подкожной имплантации ацеллюлярного сердца заживление происходило первичным натяжением. Гистологически вокруг образца обнаруживали тонкую капсулу из рыхлой волокнистой соединительной ткани, содержащую большое количество сосудов. Графт был также обильно васкуляризирован (обнаруживали до 5-6 сосудов в поле зрения при увеличении 400x). Инфильтрация клетками лимфоцитарно-макрофагального ряда была незначительной с диффузным расположением клеток.

Локальный воспалительный ответ на подкожную имплантацию децеллюляризованных матриксов выражен в значительно меньшей степени, чем при имплантации нативных тканей. Ацеллюлярные матриксы сохраняются и интегрируются в окружающие ткани вместо того, чтобы быстро деградировать и подвергаться некрозу.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ ПРИ ПАТОЛОГИЯХ СУСТАВОВ

Ступникова Т.В.¹, Кузьменко В.В.^{1,2}, Армянинова Д.К.^{1,2}, Сечкина Г.В.¹,
Вавилова Л.М.¹

1. ООО «Новейшая медицина», клиника стволовых клеток, Москва, Россия.

2. Институт Биохимической Технологии и Нанотехнологии Российского
Университета Дружбы Народов, Москва, Россия.

info@stvolkletki.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) могут рассматриваться как перспективный инструмент клеточной терапии при дегенеративных состояниях опорно-двигательного аппарата. Эти клетки обладают способностью к быстрой пролиферации и дифференциации в клетки ткани опорно-двигательного аппарата, таких как костную и хрящевую. Кроме того, эти клетки управляют важными иммунологическими функциями посредством модуляции местного иммунного ответа, а также экспрессируют ростовые факторы, которые стимулируют репаративные процессы в поврежденных тканях. Вместе эти факторы подтверждают способность МСК сдерживать дегенеративные изменения в суставах.

Под нашим наблюдением и лечением в настоящее время находятся 16 пациентов с диагнозами артрит и артроз суставов. Характер заболеваний опорно-двигательного аппарата был следующим: 3 пациента - артрит коленного сустава, 3 пациента - артроз I степени и 2 - II степень артроза коленного сустава; 4 пациента - артрит тазобедренного сустава, 3 пациента - артроз I степени и 1 - II степень артроза тазобедренного сустава. Возраст больных - от 32 до 69 лет, мужчин - 6, женщин - 10. Пациентам с интервалом в 2 месяца дважды проводили внутрисуставные инъекции суспензии аллогенных МСК ($20-50 \cdot 10^6$ клеток/сустав).

Все 16 пациентов отмечали положительный результат клеточной терапии: уменьшение болевого синдрома спустя 2 недели после первого введения, улучшение ротации сустава, уменьшение скованности движения. Эффективность клеточной терапии также оценивалась инструментальными методами. Спустя 6 месяцев после второго введения пациентам было предложено пройти контрольное обследование. В группе пациентов с артрозом I степени по результатам УЗИ в среднем произошло увеличение толщины гиалинового хряща на $31,7 \pm 6,4(\%)$, у пациентов с артрозом II степени наблюдалось утолщение хряща на $23,3 \pm 4,1(\%)$. В группе пациентов с артритом коленных и тазобедренных суставов на УЗИ отмечалось уменьшение толщины капсулы (отека) на $24,5 \pm 7,2(\%)$; на МРТ уменьшение патологического количества синовиальной жидкости в полости сустава, что свидетельствует об уменьшении воспаления.

Результаты клинического применения МСК доказывают эффективность и безопасность применения этого клеточного продукта для запуска репаративного процесса в суставной сумке.

ВЛИЯНИЕ РЕСВЕРАТРОЛА НА ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ И САМООБНОВЛЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Суворова И.И.¹, Григораш Б.Б.¹, Каминская А.Н.¹

1. Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия.

irsuorov@yandex.ru

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) являются высоко пролиферативными клетками и обладают свойством плюрипотентности - способностью образовывать все типы клеток взрослого организма. По этой причине ЭСК могут быть использованы в регенеративной медицине как неистощимый клеточный источник для получения дифференцированных тканей. Однако на сегодняшний день условия культивирования ЭСК не достаточно оптимальны и требуют дополнительных доработок. В процессе длительного культивирования часть ЭСК подвергается спонтанной дифференцировке и претерпевает мутационные изменения, что приводит к катастрофическим последствиям для будущих клеточных потомков и невозможности их использования для трансплантации. В настоящее время продолжается поиск соединений, которые могли бы войти в протокол для культивирования ЭСК. Ресвератрол - природный фитоалексин, который содержится в ряде растений как средство защиты от паразитов. На различных модельных объектах уже получены данные о положительных эффектах ресвератрола, таких как антиоксидантный, нейропротекторный, кардиопротекторный, противоопухолевый и др. Мы также предположили, что ресвератрол может положительно влиять на регуляцию плюрипотентности и самообновления ЭСК мыши.

С помощью методов ОТ-ПЦР и вестерн блоттинга мы проанализировали уровень коровых факторов, определяющих плюрипотентное состояние клеток, таких как Oct3/4, Nanog, Sox2 и Klf4. С помощью известного индуктора дифференцировки клеток - ретиноевой кислоты, мы проанализировали свойство ресвератрола задерживать дифференцировку в ЭСК мыши. Согласно полученным данным, ресвератрол незначительно влиял на уровень экспрессии маркеров плюрипотентности, однако задерживал индуцируемую ретиноевой кислотой дифференцировку в ЭСК мыши. Обнаруженный антидифференцировочный эффект ресвератрола подтверждается данными проточной цитометрии, что при совместном действии ресвератрола и ретиноевой кислоты накопление клеток в фазе G1/S клеточного цикла значительно меньше, чем при действии только ретиноевой кислоты. Таким образом, мы выявили положительный эффект ресвератрола на регуляцию плюрипотентности и самообновления ЭСК мыши.

ПРИМЕНЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ОСНОВЕ 3D БИОДЕГРАДИРУЕМОГО СКАФФОЛДА ПРИ ТЕРАПИИ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Тихобразова О.П.¹, Балябин А.В.², Гладков А.А.¹, Муравьева М.С.³, Ключев Е.А.¹, Тимашов П.С.⁴, Баграташвили В.Н.⁴, Мухина И.В.^{1,2,3}

1. НижГМА, Нижний Новгород, Россия.

2. Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр, Нижний Новгород, Россия.

3. ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия.

4. ИПЛИТ РАН, Москва, Россия.

olga.tikhobrazova@gmail.com

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) вызывает дегенерацию и гибель клеток в центральной нервной системе. Одним из наиболее перспективных методов терапии ЧМТ является нейротрансплантация стволовых или прогениторных клеток на основе 3D носителей из синтетических биodeградируемых материалов. Однако клинические и экспериментальные эффекты трансплантации клеток, создающих подходящую для регенерации тканей и нейротрансплантации среду, изучены недостаточно.

В работе на модели открытой ЧМТ мозга мышей линии C57BL/6 изучена способность нейрональных стволовых клеток гиппокампа эмбрионов мышей на основе 3D биodeградируемого скаффолда к восстановлению функций головного мозга.

3D скаффолд, выполняющий роль носителя трансплантируемых клеток и замещающий матрикс нервной ткани во время проведения реконструктивной терапии, был создан с использованием микростереолитографической техники путем комбинации модифицированного хитозана и высокомолекулярной гиалуроновой кислоты.

Показано, что трансплантация аутологических нервных стволовых клеток мозга на 3D скаффолде значительно уменьшает неврологические и поведенческие нарушения (шкала оценки неврологического дефицита, тест «открытое поле»), приводит к восстановлению функций обучения, кратковременной и долговременной памяти мышей к 6 месяцам посттравматического периода. Визуализация целостности ткани мозга с помощью высокопольной МРТ показала уменьшение объема очага повреждения по сравнению с контролем. Выявленные морфофункциональные параметры жизнедеятельности мышей свидетельствуют, что трансплантация нейрональных стволовых клеток гиппокампа на основе 3D биodeградируемого скаффолда в очаг повреждения ведет к регенерации ткани и восстановлению функций головного мозга.

Работа поддержана грантом РНФ № 14-25-00055.

ВЛИЯНИЕ АЛЛОГЕННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИХ ЯЗВ ЖЕЛУДКА У КРЫС

Трубицына И.Е.¹, Дроздова Г.А.³, Аскарлов М.Б.², Онищенко Н.А.², Абдулатипова З. М.¹, Орлова Ю.М.¹, Васнев О.С.¹.

1. ЦНИИ гастроэнтерологии МКНЦ ДЗ, Москва, Россия.
2. ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И.Шумакова» МЗ РФ, Москва, Россия.
3. РУДН, Кафедра патологической физиологии, Москва, Россия.

Введение: Нарушение заживления язвы желудка часто связаны с возникновением дисбаланса цитокина.

Цель исследования заключается в изучении влияния трансплантации аллогенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на регенерацию язвенного дефекта слизистой оболочки желудка у белых крыс.

Материалы и методы: использованы 30 белых крыс Wistar. Крысы были разделены на 3 группы. 1-я группа воспроизведение экспериментальной язвы желудка и трансплантация аллогенных МСК. 2-я группа 1 контроль, введение аллогенных МСК интактным животным. 3-я группа - контроль 2 язва желудка и введение физиологического раствора. Введение клеток проводили на 40-й день после моделирования длительно незаживающей язвы желудка. Трансплантация 1×10^6 клеток в 0,5 мл был сделан на 40-й день с помощью укола вокруг язвенного дефекта. Динамику заживления язвенного дефекта оценивали морфологически и визуально. В сыворотке крови определяли IL-4, IL-1 β , IFN- γ и TNF- α .

Обсуждение. Постепенное снижение уровня IL-1 β , IFN-gamma и TNF- α и повышение концентрации IL-4 происходило после трансплантации МСК. В группе животных без трансплантации сохранялся высокий уровень провоспалительных цитокинов и низкий уровень противовоспалительного цитокина. Заживление язвенного дефекта можно было увидеть только после трансплантации МСК.

Заключение. Трансплантация МСК ингибирует аутоиммунное воспаление, которое присутствует при длительно незаживающих язвах желудка, после введения МСК происходит восстановление дисбаланса в системе Th1 /Th2. В результате этого стимулируются процессы регенерации, что способствует заживлению язвенного дефекта.

МАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ МЕТИЛЦЕЛЛЮЛОЗЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФОСФАТЫ КАЛЬЦИЯ, ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Фадеева И.В.¹, Давыдова Г.А.², Рогатки на Е.В.¹, Антонова О.С.¹, Селезнева И.И.², Баринов С.М.¹

1. ФГБУН Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия.
2. ФГБУН Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Россия.
fadeeva_inna@mail.ru

Материалы на основе биополимеров находят широкое применение в ортопедии, стоматологии и ряде других областей медицины, и привлекают внимание исследователей во всём мире. Наиболее интересным и перспективным полимером для получения композиционных материалов медицинского назначения, использующихся в настоящее время в медицине, является метил целлюлоза (МЦ). МЦ используют в качестве наполнителя в кремах, зубных пастах, при заполнении обширных дефектов, возникающих в процессе оперативных вмешательств.

Плётки из МЦ получали растворением 2,5 г МЦ в 97,5 мл воды с последующим формованием плётки на подложке. Для уменьшения растворимости плётки в раствор МЦ вводили 0,625г альгината натрия (массовое соотношение альгинат:МЦ = 1:4). После полного растворения альгината к смеси полимеров добавляли в качестве сшивающего агента хлориды железа (+2), железа (+3), цинка, магния, меди или алюминия. Исследование цитотоксичности проводили с использованием вытяжек и самих материалов согласно требованиям. В качестве модельной среды для приготовления вытяжек была использована культуральная среда ДМЕМ/F12 с добавлением 100 Ед/мл пенициллин/стрептомицина. Приготовление вытяжек проводилось с соблюдением асептики в течение 3 суток при 37 $^{\circ}$ С, на каждый материал делали три пробы. Соотношение массы экстрагируемых материалов в граммах и объема модельной среды в миллилитрах составляло 0,3. В эксперименте использовали фибробласты линии NCTCL929. Клетки высевали в лунки 96-ти луночного планшета в концентрации 40 тыс. кл./см² в среде ДМЕМ/F12 содержащей 5% FBS. Для изучения адгезивных характеристик материалов и определения их цитотоксичности для клеток использовали метод прямого контакта. При проведении данного исследования использовали первичную культуру фибробластов человека.

Посев клеток на поверхность несшитых и частично сшитых хлоридом бария плёнок из МЦ и исследование их жизнеспособности (метод пря-

мого контакта) позволил установить отсутствие токсического действия. По результатам *in vitro* тестирования плёнки на основе МЦ с альгинатом натрия, частично шитые хлоридом бария, могут быть признаны биосовместимыми. Разработанные материалы перспективны для использования в медицине.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 16-03-00820.

МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ ДО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Федотовских Г.В.¹, Аскарров М.Б., Шаймарданова Г.М., Марат С.,
Жакупова А., Алпыспаева А., Смелова А.М.

1. АО «Национальный научный медицинский центр», г.Астана, Казахстан.
Gvf_fedotovskikh@mail.ru

Многие механизмы и пути реализации технологических эффектов клеточной терапии нуждаются в серьезном научном обосновании. Аутологичные клетки костного мозга, взятые для клеточной терапии у больных с длительной хронической патологией, характеризуются снижением биорегуляторной активности и нарушением продукции тканеспецифических факторов роста (О.И.Степанова и др., 2013). В цель настоящей работы входило оценить на ультраструктурном уровне морфо-функциональное состояние аутологичных клеток гемопоэтической фракции костного мозга до культивирования при некоторых аутоиммунных заболеваниях.

Для электронномикроскопического исследования гемопоэтические клетки моноклеарной фракции костного мозга, взятые у 7 больных с аутоиммунными заболеваниями фиксировали в 2,5% растворе глутаральдегида с постфиксацией в 1% растворе четырехоксида осмия, проводили по общепринятой методике и заключали в эпон. Ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме Leica, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по Рейнольдсу, исследовали в электронном микроскопе Libra 120 (C. Zeiss).

Несмотря на принадлежность к различным морфологическим классам, клетки костного мозга на электронномикроскопическом уровне характеризовались выраженными ультраструктурными изменениями. Митохондрии имели осмиофильный матрикс, резко расширенные и деструктивно измененные кристы. Отмечена вакуолизация и деструкция наружной митохондриальной мембраны. Канальцы гранулярного эндоплазматического ретикулума были расширены и дегранулированы. Эндосомы содержали деструктивно измененные экзосомы.

Таким образом, морфо-функциональное состояние клеток костного мозга больных с тяжелой аутоиммунной патологией характеризовалось энергетической дисфункцией митохондрий, белковой и микровезикулярной недостаточностью, что определяет особенности биотехнологических подходов к повышению функциональной активности трансплантируемого клеточного материала.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ОФТАЛЬМОЛОГИИ

Хорольская Ю.И.1,2, Александрова О.И.¹, Околов И.Н.³, Блинова М.И.¹

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.
2. Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия.
3. Санкт-Петербургский филиал ФГБУ «МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад. С. Н. Федорова» МЗ России, Санкт-Петербург, Россия.
juliya_khorolskaya@mail.ru

Оценка цитотоксичности лекарственных препаратов в рамках стандартов надлежащей лабораторной практики (GLP) является необходимым этапом их исследования на доклиническом этапе. В настоящее время в качестве ключевой технологии для характеристики свойств новых химических соединений на ранних этапах процесса разработки лекарственных средств рассматривается биологический скрининг *in vitro*. Для офтальмологии разработка методов определения потенциальной опасности лекарственных препаратов особенно актуальна, так как традиционные методы часто оказываются недостаточно информативными. Применение клеточных тест-систем для оценки цитотоксического действия офтальмологических препаратов в условиях *in vitro* может решить проблему выбора лекарственного средства и устранения нежелательных реакций, возникающих при лекарственной терапии.

В ходе нашей работы проводились исследования токсичности офтальмологических препаратов различных фармакологических групп (антибактериальные, противовоспалительные, слезозаместительные лекарственные средства). В качестве тест-систем были использованы первичные клеточные линии фибробластов человека и лимбальные стволовые клетки кролика, а также трансформированные клеточные линии Clone 1-5с-4 (клетки конъюнктивы человека) и НЕСС (клетки роговицы человека). При исследовании слезозаместительных препаратов была разработана экспериментальная модель «сухого глаза» на основе клеток роговицы человека. Жизнеспособность клеток, культивируемых в питательных средах с добавлением тестируемых препаратов, определяли при помощи МТТ-теста и клеточного анализа xCELLigence. Проведенное исследование показало принципиальную возможность использования клеточных тест-систем для сравнительной оценки цитотоксического действия офтальмологических препаратов в условиях *in vitro*.

Работа выполнена в рамках проекта РНФ № 14-50-00068

ВЛИЯНИЕ КЛЕТОК КАРДИАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ НА ВОССТАНОВЛЕНИЕ ТКАНЕЙ СЕРДЦА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ИНФАРКТА МИОКАРДА У КРЫС

Чепелева Е.В.¹, Павлова С.В.^{1,2}, Малахова А.А.^{1,2}, Русакова Я.Л.¹, Милевская Е.А.¹, Сергеевичев Д.С.¹

1. ФГБУ Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ, г. Новосибирск, Россия.
2. ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск, Россия.
amareza@mail.ru

При ишемическом поражении миокарда происходит утрата здоровых кардиомиоцитов путем апоптоза и/или некроза, а также нарушение кровоснабжения в пораженной ткани. Большие перспективы в восстановлении функции миокарда открывают методы клеточной терапии, предлагающие пациентам возможность восстановительного лечения в дополнение к используемым в настоящее время фармакологическим и электрофизиологическим методам.

Для исследования влияния кардиоваскулярной культуры, содержащей региональные стволовые клетки, на восстановление тканей сердца после инфаркта миокарда проводили эксперименты на животной модели. У лабораторных крыс линии WAG в процессе хирургической операции получали модель инфаркта миокарда. Кардиальные стволовые клетки вводили в миокард через 6 недель после инфаркта, в качестве контроля использовали введение PBS. Методом Эхо-КГ было показано достоверное увеличение ударного объема и диаметра корня аорты в группе опытных животных по сравнению с контрольной группой. При анализе гистологических препаратов криосрезов сегментов сердца было показано, что у опытной группы крыс относительная площадь пораженной ткани была достоверно меньше по сравнению с контрольной группой. Методом иммунофлуоресцентного анализа криосрезов было показано увеличение плотности сосудов в перирубцовой зоне сердца крыс опытной группы.

Таким образом, имплантация клеток полученной культуры в область левого желудочка у крыс линии WAG с ишемическим повреждением миокарда снижает объем рубцовой ткани, приводит к ангиогенезу в очаге поражения и предотвращает риск развития сердечной недостаточности.

МИКРОЦИРКУЛЯЦИЯ В ТКАНЯХ, ПОДВЕРГШИХСЯ КОМПРЕССИОННОЙ ТРАВМЕ, ПОСЛЕ РЕГИОНАРНОЙ ПЕРЕСАДКИ КЛЕТОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Шулепов А.В.¹, Юркевич Ю.В.¹, Шперлинг Н.В.¹, Адылов Ш.Ф.²,
Айзенштадт А.А.², Шперлинг М.И.³

1. ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.
 2. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия.
 3. ФГБВОУВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия.
- soash@mail.ru*

Реваскуляризация регенерирующих скелетных мышц на микроциркуляторном уровне опосредуется экспрессией клеточных ангиогенных ростовых факторов. Вклад мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК) в процесс посттравматической регенерации и реваскуляризации поврежденных скелетных мышц доказан. В этой связи практический интерес представляют паракринные потенции ММСК в аспекте комплексной оценки состояния микроциркуляции в области компрессионно-ишемического повреждения мягких тканей.

Исследование выполнено на крысах-самцах, которым через 3 часа после декомпрессии в зону повреждения выполнялась внутримышечная пересадка культивированных ММСК жировой ткани человека в составе 1,75% геля низкомолекулярной гиалуроновой кислоты (Hyalift 3,5, Испания). Состояние микроциркуляции в зоне компрессии определяли методом лазерной доплеровской микрофлуометрии устройством «ЛАКК-М» (НПП «Лазма», Россия).

Установлено, что ранний посткомпрессионный период характеризуется существенным (на 40%, $p \leq 0,05$) угнетением микроциркуляции в зоне сдавления по сравнению с аналогичной областью неповрежденной конечности, свидетельствуя о развитии перфузионных повреждений. Снижение показателя средней перфузии и ее переменной составляющей в микроциркуляторном русле травмированных животных, которым производили пересадку ММСК в область повреждения, составляло не более 23-25% ($p \leq 0,05$). В последующие сроки наблюдения (14-24 сутки) различия выраженности перфузионных нарушений при регионарном введении ММСК еще более нивелировались и не превышали 8%. Анализ показателей кислородного снабжения травмированных тканей также позволил выявить у животных с пересадкой ММСК улучшение кислородного пи-

тания тканей в условиях нарушенного кровообращения. Прирост индекса перфузионной сатурации кислорода в микрокровоотоке был в 2 раза ($p \leq 0,05$) ниже, чем в контроле, свидетельствуя о связи интенсивности микроциркуляции с восстановлением потребления кислорода тканями. Аналогичные корреляции установлены при оценке флуоресцентной контрастности биоткани по восстановленной форме НАДН.

Таким образом, регионарная пересадка культивированных ММСК человека в область ишемического поражения конечности позволяет снизить выраженность перфузионных повреждений мягких тканей, обеспечить улучшение кислородного питания тканей в условиях нарушенного кровообращения, повысить напряженность восстановительных процессов в поврежденной мышечной ткани.

ПОЛУЧЕНИЕ МОДЕЛИ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ПОТЕНЦИАЛА В РАЗЛИЧНЫХ НАПРАВЛЕНИЯХ

Яппарова О. Н. \ Мифтахова Р. Р.²

1. Студентка 1 курса магистратуры К(П)ФУ, Казань, Россия.
2. КФУ им.Ленина, НИЛ клеточных и генных технологий, Казань, Россия.
olesya.n.yapparova@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) жировой ткани человека являются перспективным материалом для фундаментальных знаний при исследовании регенеративной медицины и тканевой инженерии, за счет своих мультипотентных свойств, относительно легкого процесса выделения клеток, и способности клеток к направленной миграции в поврежденные участки организма. Однако ограниченная пролиферация и снижение дифференцировочного потенциала первичных МСК *in vitro* значительно препятствуют проведению длительных лабораторных исследований при изучении биологии МСК.

Целью работы является immortalization МСК жировой ткани человека и исследование свойств immortalized линии клеток.

В ходе работы были изучены современные подходы immortalization клеток эукариот и получение immortalized линии мезенхимных стволовых клеток человека (иМСК) оптимально подобранным способом, а именно, посредством подавления экспрессии гена p53 и гиперэкспрессии каталитического компонента человеческой теломеразы (hTERT). Изменений в морфологии клеток не было обнаружено. Методом проточной цитофлуориметрии была показана экспрессия типовых маркеров МСК, включая CD90, CD105 и CD73, и отсутствие экспрессии маркеров гемопоэтических клеток CD45, CD34, CD11b, CD19 и HLA-DR. Оценка активности пролиферации клеток проводили с помощью МТТ-теста, результаты показали, что время удвоения популяции иМСК *in vitro* значительно сократилось, по сравнению с родительской линией клеток. Дифференцировочный потенциал клеток в адипогенном, хондрогенном, остеогенном направлениях был оценен на 10-33 пассажах. Вне зависимости от пассажа иМСК способность клеток к дифференцировке сохранилась, показывая высокую эффективность дифференцировочного потенциала исследуемых клеток.

В результате выполненной работы была получена линия иМСК, обладающая высокой пролиферативной активностью и сохранившая потенциал к дифференцировке на поздних пассажах. Наши результаты свиде-

тельствуют, что полученная клеточная линия может являться модельной для проведения лабораторных исследований по изучению потенциала применения МСК в регенеративной медицине.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Айзенштадт А.А.</i> , Создание банка культур мезенхимных стволовых клеток пупочного канатика человека.....	5
<i>Александрова О.И.</i> , Клеточные технологии для регенерации роговицы.....	7
<i>Архипова С.С.</i> , Исследование биосовместимости искусственного каркаса для тканевой инженерии (in vitro)	8
<i>Баклаушев В.П.</i> , 3D-тканеинженерные конструкции на основе двухкомпонентного матрикса и нейральных стволовых клеток.....	10
<i>Belostotskaya G.B.</i> , What cells are able to renew and regenerate the mammalian myocardium?	12
<i>Блинова М.И.</i> , Успехи и проблемы клеточных технологий (опыт ИИЦ РАН).....	13
<i>Гайдаш А.А.</i> , Влияние мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток в композите с биоситаллом на процессы остеоинтеграции в экспериментальных условиях in vitro	14
<i>Докукина Л.Н.</i> , Аутологичные клетки в практике детской комбустиологии	16
<i>Дрык С.И.</i> , Опыт организации банка стволовых клеток в республике Беларусь.....	17
<i>Енукашвили Н.И.</i> , Возможность и механизмы спонтанной трансформации мезенхимных стволовых клеток человека.....	19
<i>Ефименко А.Ю.</i> , Разработка нового биоматериала на основе продуктов секреции мезенхимных стромальных клеток человека.....	21
<i>Kaminskaya A.N.</i> , The regulation of mTOR-signaling by FGFR/ERK pathway in mouse Primed embryonic stem cells, II-23.....	23
<i>Китаева К.В.</i> , Гендерные различия ММСК жировой ткани и костного мозга. Потенциальные приложения в тканевой инженерии	24
<i>Князев О.В.</i> , Эффективность лечения пациентов с люминальной формой болезни крона мезенхимальными стромальными клетками - 7 лет наблюдения ...	25
<i>Князев О.В.</i> , Влияние комбинированной терапии мезенхимальными стромальными клетками и азатиоприна на клиническое течение болезни крона	27
<i>Кошелева Н.В.</i> , Новая модель для изучения процессов репарации in vitro на основе лазерной микрохирургии клеточных сфероидов.....	29
<i>Кузнецова Д.С.</i> , Формирование костной ткани при имплантации скаффолдов с МСК. Роль аллогенных клеток	31
<i>Лыков А.П.</i> , Опухоль-ассоциированные мезенхимальные стромальные клетки при химически-индуцированном раке молочной железы.....	32
<i>Mavlikeev M.O.</i> , Evaluation of a new bioartificial scaffold for tissue engineering of esophagus in rats.....	33
<i>Макаревич П.И.</i> , Методы терапии с использованием стволовых клеток взрослого организма: генетическая модификация и создание тканеинженерных конструкций на их основе.....	34

<i>Malashicheva A.B.</i> , Notch signaling in differentiation: through fundamental mechanisms to understanding cardiovascular pathology	36
<i>Орехов П.Ю.</i> , Клинические Результаты лечения критической ишемии нижних конечностей аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками.....	37
<i>Орлов А.А.</i> , Влияние трансплантации мезенхимных стволовых клеток на репаративный остеогенетический процесс.....	38
<i>Павлова Г.В.</i> , Модификации GDNF и их роль в процессах нейральной дифференцировки прогениторных клеток	40
<i>Плехова Н.Г.</i> , Мезенхимные стволовые клетки в регенерации костной ткани.....	42
<i>Подгорная О.И.</i> , Транскрипты диспергированных повторов в регуляции плюрипотентности.....	43
<i>Попов Б.В.</i> , Эпигенетическая регуляция жировой дифференцировки мезенхимных стволовых клеток путём метилирования сайта H3K27	45
<i>Салафутдинов И.И.</i> , In vitro оценка васкулогенеза и ангиогенеза при использовании нового искусственного материала для тканевой инженерии	49
<i>Сидоренко О.Е.</i> , 3D-моделирование тканей на пористых носителях в перфузионном эксперименте.....	51
<i>Стригина Е.В.</i> , Эпигенетический статус X-хромосом в плюрипотентных стволовых клетках человека	52
<i>Суздальцева Ю.Г.</i> , Мезенхимные стволовые клетки в развитии фиброза при заживлении тканевых дефектов: новые подходы к изучению молекулярных механизмов регенерации тканей.....	53
<i>Titova A.A.</i> , Are mesenchymal stromal microvesicles alone potentially useful for cell seeding of bioartificial scaffolds?	55
<i>Ткачук В.А.</i> , Мезенхимные стволовые клетки в процессах обновления и регенерации тканей.....	56
<i>Томилин А.Н.</i> , Плюрипотентные стволовые клетки.....	57
<i>Тулина М.А.</i> , Разработка проекта правил надлежащей практики по работе с биомедицинскими клеточными продуктами.....	58
<i>Тюмина О.В.</i> , Направленная дифференцировка CD34+ клеток человека в мегакариоциты и тромбоциты	59
<i>Шаймарданова Г.Ф.</i> , Восстановление двигательной активности у крыс после контузионной травмы спинного мозга и интратекального введения клеток крови пуповины, трансдуцированных аденовирусом	61
<i>Юдинцева Н.М.</i> , Исследование эффективности влияния мезенхимальных стромальных клеток костного мозга при реконструкции мочевого пузыря	63
<i>Arindam Bit</i> , Enhanced cryopreservation of MSCs in microfluidic bioreactor by regulated shear flow.....	65

<i>Фадеева Н.П.</i> , Микрофлюидика как основа воспроизводимого перепрограммирования стволовых клеток.....	66
<i>Christoph Hoefler</i> , humanity in a dish: key technologies for disease modelling with human pluripotent stem cells	67
<i>Macchiarini P.</i> , First outcome of tissue-engineered transplantation of bioartificial scaffold in non human primates	68
<i>Wolfgang Parak</i> , Nanoparticles and stem cells, a powerful combination?.....	70
<i>Jungebluth Ph.</i> , Biological esophageal scaffolds: quo vadis?.....	71
Постерная сессия	
<i>Афанасьев С.А.</i> , Возможность заселения клеточного материала в матриксы, полученные методами электроспиннинга и аэродинамического формования в турбулентном газовом потоке, II-1	72
<i>Ахметзянова Э.Р.</i> , Количественные изменения в популяции клеток микроглии при генно-клеточной терапии травмы спинного мозга крыс, II-12	73
<i>Баранова Д.Н.</i> , Анализ эндцитоза рецептора эпидермального фактора роста в мезенхимных стволовых клетках, I-1.....	74
<i>Блинова Е.А.</i> , Динамика экспрессии PD-1 на Т-лимфоцитах в ходе иммунотерапии активированными Т-клетками у пациентов с atopическим дерматитом	76
<i>Божокин М.С.</i> , Результаты имплантации биodeградируемой мембраны на основе полилактида в эксперименте, II-2	78
<i>Бородкина А.В.</i> , Кальций-зависимая регуляция преждевременного старения и аутофагии в эндометриальных стволовых клетках человека в условиях окислительного стресса, I-24	80
<i>Бриллиант А.А.</i> , Пролиферативная активность опухолевых стволовых клеток рака молочной железы, I-2	81
<i>Бухарова Т.Б.</i> , Влияние криоконсервации на остеогенный потенциал мультипотентных стромальных клеток из пульпы зуба, I-3	83
<i>Vasina E. V.</i> , Clinical-grade MSC-associated hematopoietic CD34+ cells expansion	84
<i>Волгина Н.Е.</i> , Сыворотка пуповинной крови человека: эффективная замена эмбриональной телячьей сыворотки для культивирования мезенхимальных стромальных клеток человека	85
<i>Гилазиева З.Е.</i> , Изучение ультраструктуры жировых мезенхимальных клеток человека после влияния цисплатина, I-4.....	86
<i>Глазова М.В.</i> , Анализ нейрогенеза у крыс линии крушинского-молодкиной, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам, I-5	87
<i>Гончаренко А.В.</i> , Остеогенная дифференцировка мезенхимальных стволовых клеток на фиброиновых микроносителях, II-3	89
<i>Горкун А.А.</i> , Сохранение функциональности при 3D культивировании клеток-производных нервного гребня, II-4.....	90

<i>Григорьев Т.Е.</i> , Разработка термотропных гидрогелей на основе хитозана для замещения костных дефектов, II-5	92
<i>Гуменюки С.</i> , Автоматизированный морфометрический анализ микропрепаратов при создании тканеинженерных конструкций органов и тканей, I-26.....	93
<i>Енукашвили Н.И.</i> , Функциональный анализ МСК как критерий при выборе источника для клеточной терапии, II-13	95
<i>Заморина С.А.</i> , Влияние трофобластического β 1-гликопротеина на продукцию хемокинов мононуклеарными клетками человека, I-31	97
<i>Зосен Д.В.</i> , Пролиферация и дифференцировка нейрональных стволовых клеток in vitro: роль p53 и GSK3 β , I-6.....	98
<i>Иванищева К.А.</i> , Применение маркера KI-67 в диагностике старения иммунной системы, I-7	100
<i>Иванова Е.А.</i> , Взаимодействие мезенхимных стволовых клеток, выделенных из костного мозга, с трехмерным скаффолдом и влияние скаффолда на функциональную активность клеток, II-6	102
<i>D. Ivlgin</i> , Umbilical cord blood in liver fibrosis therapy - new opportunity?, I-32.....	105
<i>D. Ivlgin</i> , Umbilical cord blood processing: quality improvement, I-33	107
<i>Ионов П.М.</i> , использование культивированных аллогенных фибробластов в комплексном безоперационном лечении бронхиальных свищей после пневмонэктомий, II-14.....	108
<i>Каширова А.О.</i> , Культивирование мезенхимных стволовых клеток на полилактидных скаффолдах, II-7.....	110
<i>Кирсанова В.А.</i> , Исследование цитосовместимости брушитоцементов на основе альфа-трикальцийфосфата, предназначенного для замещения костных дефектов	111
<i>Кольцова А.М.</i> , Пупочный канатик - источник мезенхимных стволовых клеток человека, I-8	113
<i>Копелев П.В.</i> , Распределение по поверхности и наработка внеклеточного матрикса клеток с хондрогенным потенциалом при культивировании на полилактидных скаффолдах, модифицированных хондроитинсульфатом	115
<i>Крашенинников С.В.</i> , Пористые материалы на основе полилактида для регенерации костной ткани, II-8.....	116
<i>Кувееда Е.В.</i> , Динамическая кондуктометрия как метод оценки эффективности воздействия детергентов при децеллюляризации, I-27	117
<i>Кувееда Е.В.</i> , Изучение цитотоксических свойств антисептиков при стерилизации биологических каркасов легких крысы, I-28.....	119
<i>Лабутин Д.В.</i> , Дозозависимое снижение жизнеспособности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) in vitro под действием НПВП, I-9.....	121
<i>Литвинова Л.С.</i> , Дисбаланс роста опухолевых клеток при краткосрочном культивировании с рельефным кальцийфосфатным покрытием на титане, II-9	123

<i>Лыков А.П.</i> , Сравнительная эффективность клеточного продукта в терапии воспалительно-дегенеративных заболеваний, II-15	124
<i>Маклакова И.Ю.</i> , Возможность использования клеточных технологий для восстановления регенерации эпителия кишечника после воздействия экстремальных факторов, II-16	126
<i>Малюченко Н.В.</i> , Влияние 3D культивирования на экспрессию молекул адгезии на мембранах мышинных эмбриональных фибробластов, I-10	128
<i>Матвеева В.А.</i> , Культивируемые клетки функционального слоя эндометрия человека в эксперименте, I-11	129
<i>Моисеева Е.В.</i> , Суспензионный сфероидоподобный слой индивидуальной культуры рака молочной железы содержит стволовые клетки опухоли?, I-12	130
<i>Накохов Р.З.</i> , Оптимизация протокола децеллюляризации пищевода крыс, I-29	131
<i>Нащекина Ю.А.</i> , Использование биodeградируемых полимерных скаффолдов для целей и задач клеточных технологий	132
<i>Немков А.С.</i> , Сравнительная оценка различных способов выделения аутологичных мононуклеаров костного мозга, I-13	133
<i>Полетика В.С.</i> , Роль мезенхимальных стволовых клеток в формировании опухолевой ниши при раке молочной железы, I-25	135
<i>Полтавцев А.М.</i> , Продукция растворимых факторов в смешанных культурах мезенхимальных стромальных клеток и гетерологичных лимфоцитов, I-14	136
<i>Полтавцева Р.А.</i> , Влияние мезенхимальных стромальных клеток на пролиферацию лимфоцитов периферической крови в смешанных и мембран-разделенных культурах, I-15	137
<i>Попов Г.И.</i> , Разработка и оценка эффективности биodeградируемой матрицы для создания тканеинженерного сосудистого имплантата в длительном хроническом эксперименте, II-10	138
<i>Романов Ю.А.</i> , Экспрессия поверхностных молекул мезенхимальными стромальными клетками человека при сокультивировании с ядродержащими клетками пуповинной крови	140
<i>Салова А.В.</i> , Рецептор ЭФР в мезенхимных стволовых клетках, I-16	142
<i>Семенова Н.Ю.</i> , Морфологические особенности гемопозитической ниши приХЛЛ, I-34	143
<i>Сергеева Н.С.</i> , Исследование состава и функциональных свойств лизата тромбоцитов (ЛТ) человека как ростовой добавки для культивирования различных типов клеток, предназначенных для клеточной терапии/тканевой инженерии, I-17	145
<i>Сечкина Г.В.</i> , Терапевтический потенциал мезенхимальных стволовых клеток в лечении детского церебрального паралича, II-17	147
<i>Скибина К.П.</i> , Эффективность клеточной терапии в лечении яичниковой недостаточности, вызванной химиотерапией	148
<i>Смагина Л.В.</i> , Дифференцировка мезенхимных стволовых клеток человека, полученных из разных источников и динамика активности матриксных металлопротеиназ, I-18	150

<i>Смирнова Н.В.</i> , Воздействие холодной плазмы атмосферного давления на механизмы тканевой регенерации in vitro и in vivo, I-19	151
<i>Сотниченко А.С.</i> , Подкожная имплантация как метод изучения иммуногенных и провоспалительных свойств децеллюляризованного матрикса сердца, I-30	153
<i>Ступникова Т.В.</i> , Клеточная терапия при патологиях суставов, II-18	155
<i>Суворова И.И.</i> , Влияние ресвератрола на плюрипотентность и самообновление эмбриональных стволовых клеток, I-20	157
<i>Тихобразова О.П.</i> , Применение нейрональных стволовых клеток на основе 3D биodeградируемого скаффолда при терапии черепно-мозговой травмы, II-19	158
<i>Трубицына И.Е.</i> , Влияние аллогенных мононуклеарных клеток костного мозга на регенерацию длительно незаживающих язв желудка у крыс, II-20	159
<i>Фадеева И.В.</i> , Материалы на основе метил целлюлозы, содержащие фосфаты кальция, для медицины, II-11	160
<i>Федотовских Г.В.</i> , Морфо-функциональное состояние клеток костного мозга при хронической патологии до культивирования, I-21	162
<i>Хорольская Ю.И.</i> , Клеточные тест-системы в офтальмологии, II-21	163
<i>Челелева Е.В.</i> , Влияние клеток кардиальной культуры на восстановление тканей сердца при моделировании инфаркта миокарда у крыс, I-22	164
<i>Шулепов А.В.</i> , Микроциркуляция в тканях, подвергшихся компрессионной травме, после регионарной пересадки клеточного трансплантата на основе мезенхимных стромальных клеток, II-22	165
<i>Яппарова О. Н.</i> , Получение модели клеточной линии иммортализованных мезенхимных стволовых клеток человека, анализ пролиферации и дифференцировочного потенциала в различных направлениях, I-23	167

