

 **StemCellBio 2018**

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ НАУКА КАК
ОСНОВА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ

15-17 ноября
г.Санкт-Петербург



**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
ВСЕРОССИЙСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ**

**«StemCellBio-2018:
фундаментальная наука
как основа клеточных технологий»
15 -17 ноября 2018 г.
г. Санкт-Петербург**

ДОКЛАДЫ УСТНЫЕ

NON-TUMORIGENIC GENETIC INSTABILITY IN PROGENY OF HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STEM CELLS SURVIVED HEAT SHOCK

Anatskaya O.V.^{1*}, Shilina M.A.¹, Vinogradov A.E.¹, Grinchuk T.M.¹, Elmuratov A.U.², Korostin D.O.², Tsyganov O.V.², Ilinsky V.V.², Kim A.², Krasnenko A.Y.², Nikolsky N.N.¹

1. *Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia*

2. *Genotek Ltd, Moscow, Russia*

**olga.anatskaya@gmail.com*

Heat stress (HS) pretreatment is a promising strategy to improve mesenchymal stem cells (MSC) therapeutic effects. Nevertheless, the long-term effects of HS on MSC remain unstudied. Our previous data indicated that human endometrial MSC progeny that survived sublethal heat stress (SHS-SP) demonstrated non-tumorigenic genetic instability. To uncover the nature of HS associated genome integrity disruption and to uncover the nature of its non-tumorigenicity, we investigated activity of DNA repair pathways at the sixth passage after HS treatment. Using methods of mRNA sequencing, protein-protein interaction network cluster analysis, biological pathway investigation and standard gene lists comparison, we indicated that HS causes long-term homologous recombination (HR) deficiency that is most likely originated from low thermostability of the AT-rich HR driving genes. SHS-SP protection from transformation is provided by low oncogene expression maintained by tight co-regulation between thermosensitive HR drivers BRCA, ATM, ATR, RAD51 (that decreased expression after sublethal HS treatment) and oncogenes mTOR, MDM2, KRAS, EGFR and JUN. The transformation-related features previously identified in hTERT transformed MSC in culture was not found in SHS-SP suggesting no traits of transformation in them. The entrance of these cells into the phase of replicative aging confirms their mortality and potential genetic safety. The entrance of these cells into the phase of replicative aging confirms their mortality.

This work was supported by Russian Science Foundation, grant №14-50-00068.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ БЫСТРО ПРОГРЕССИРУЮЩЕГО ИДИОПАТИЧЕСКОГО ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА - РЕЗУЛЬТАТЫ РАНДОМИЗИРОВАННОГО ПЛАЦЕБО КОНТРОЛИРОВАННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Аверьянов А.В., Коноплянников М.А., Королева И.А., Сотникова А.Г., Кальсин В.А., Баклаушев В.П.

Федеральный научно-клинический центр ФМБА России, Ореховый бульвар, 28, Москва, Россия

*ФГБУ НИИ пульмонологии ФМБА России, Ореховый бульвар, 28, Москва, Россия
averyanovav@mail.ru*

Идиопатический легочный фиброз – редкое хроническое прогрессирующее заболевание неизвестной этиологии, характеризующееся замещением паренхимы легких соединительной тканью, приводящее к развитию тяжелой дыхательной недостаточности. Как показали исследования последних лет, традиционное лечение этого заболевания кортикостероидными или цитостатическими препаратами малоэффективно и приводит к развитию многочисленных осложнений. Современные антифиброзные препараты хотя и уменьшают скорость прогрессирования заболевания, но в силу их высокой стоимости практически недоступны для пациентов. В многочисленных экспериментальных исследованиях была показана эффективность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) по сдерживанию развития фиброза легких. Целью нашего пилотного клинического исследования, проведенного в 2013-2016 гг., была оценка безопасности и эффективности терапии МСК костного мозга у пациентов с быстрым прогрессированием ИЛФ.

Материалы и методы. В исследование были включены 20 пациентов: 12 мужчин, 8 женщин в возрасте от 49 до 72 лет с подтвержденным диагнозом идиопатического легочного фиброза со снижением жизненной емкости легких (ФЖЕЛ) или коэффициента диффузии (DLCO) более чем на 10% за 12 месяцев, предшествующих включению. Пациенты были рандомизированы в 2 группы по 10 пациентов в каждой, одна из которых в течение 1 года каждые 3 месяца получала 2 внутривенных инфузии суспензии донорских мезенхимальных стволовых клеток костного мозга по 200 млн клеток в каждой, а вторая - внутривенные инфузии метилпреднизолона 125 мг в том же режиме. Оценивались нежелательные побочные явления и динамика функциональных и рентгенологических проявлений интерстициальных изменений в легких.

Результаты. В течение исследования умерло 4 пациента от прогрессирования дыхательной недостаточности (по 2 из каждой группы). Из остальных больных в группе терапии МСК у двух пациентов наблюдалось

дальнейшее прогрессирование заболевания, четверо демонстрировали стабильность функциональных показателей, а у оставшихся двоих в течение 12 месяцев наблюдалось увеличение ФЖЕЛ до 27% и DLCO до 49%. При компьютерной томографии высоких разрешений у выживших пациентов через 12 месяцев лечения МСК не установлено существенной динамики признаков интерстициального поражения. Из нежелательных побочных эффектов у 40% больных, получавших МСК, зафиксированы головокружения, чувство жара, субфебрильная лихорадка в день проведения инфузий.

Выводы. Терапия аллогенными МСК костного мозга пациентам с быстро прогрессирующим течением ИЛФ в кумулятивной дозе 1.6×10^9 клеток продемонстрировала отсутствие серьезных нежелательных побочных эффектов и умеренную функциональную и клиническую эффективность без значимых изменений рентгенологических проявлений интерстициального процесса в легких.

ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ EX VIVO

Айзенштадт А.А.*

Oslo University hospital, Norwegian Center for Stem Cell Research, Осло, Норвегия

*aizendt@gmail.com

Изучение нервной ткани человека всегда было осложнено ограниченной доступностью материала для исследований. С помощью моделей на лабораторных животных невозможно воспроизвести многие значимые компоненты патологического процесса или развития нервной ткани человека. В связи с этими ограничениями, не смотря на многие годы интенсивных исследований, для многих нейродегенеративных заболеваний, например, бокового амиотрофического склероза или болезни Альцгеймера, отсутствует лечение. Технологии репрограммирования и последующей дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) открывают новый путь для дальнейшего понимания механизмов функционирования, развития и заболеваний нервной ткани и мозга человека. При этом стандартные двухмерные условия культивирования не позволяют воспроизвести сложность структуры нервной ткани, поскольку необходимо не только получить функциональные нейроны, но и учесть элементы их микроокружения, включая белки внеклеточного матрикса, и взаимодействие с другими типами клеток. Создание трехмерных культур на основе специализированных типов клеток, дифференцированных из иПСК, и органоидов, а также использование микрофлюидных чипов позволит заполнить разрыв между *in vitro* и *in vivo* моделями и даже частично заменить их.

В докладе будет представлен обзор современных подходов *ex vivo* моделирования нейродегенеративных заболеваний, в частности бокового амиотрофического склероза. Будут рассмотрены основные ограничения и сложности при создании таких моделей, а также освещены потенциальные и существующие способы их решения.

Технологии анализа клеточного метаболизма и биоэнергетики Seahorse Bioscience (a part of Agilent) помогают расширять и углублять молекулярные и генетические исследования. Сделайте Вашу работу более масштабной вместе с Seahorse Bioscience.

Seahorse Bioscience

A part of Agilent Technologies



Технология Seahorse – золотой стандарт в изучении клеточного метаболизма

- Онкология
- Клеточная биология
- Токсикология
- Сердечно-сосудистые заболевания
- Иммунология
- Нейродегенеративные заболевания
- Трансляционная медицина
- Болезни обмена веществ: ожирение/диабет
- Доклинические испытания фармацевтических субстанций

Основные черты технологии Seahorse Bioscience:

- Подходит для работы с любыми типами клеток
- Клеточный ответ в реальном времени (1,5 – 2 часа запуск)
- Исследования в микропланшетах (8, 24, 96 лунок)
- Анализ метаболических сдвигов
- Тесты на цитотоксичность
- Возможность добавления 4-х препаратов в реакционную среду
- Подбор эффективной дозы препарата
- Готовые тест-наборы
- Адаптированные для каждого типа клеток протоколы
- Удобное интуитивное понятное программное обеспечение Wave для создания протоколов, анализа и интерпретации или переноса данных

ВЫБЕРИ СВОЙ АНАЛИЗАТОР

Seahorse Bioscience

XFp Analyzer



XF24 Analyzer



XF96 Analyzer



Количество лунок для исследований

6

24

96

Порты для инъекции препарата

4 шт

4 шт

4 шт

Решаемые задачи

- Сравнительные попарные исследования
- Анализ редких образцов (образцы после анализа можно пустить на другие исследования или сохранить)
- Свежие образцы от пациента

- Анализ клеточных островков
- Анализ биоптатов, срезов, микротомов
- Исследования модельных организмов, небольших эмбрионов
- Стандартные метаболические исследования на клеточных культурах

- Высокопроизводительные анализы, возможность разноформатных исследований в одном 96-луночном планшете
- Исследования дозо-чувствительности клеток к препарату
- Анализ сфероидов и 3D-культур

Ключевые преимущества

- Компактный, настольный, полностью интегрированный, удобный в обращении инструмент
- Стандартизированные протоколы метаболических стресс-тестов

- Увеличенный объем лунки (позволяет работать с островками, биоптатами, срезами тканей)
- Валидирован для исследований гипоксии

- Максимальная гибкость при выборе эксперимента
- Высочайшая производительность
- Валидирован для исследований гипоксии



Группа компаний «БиоХимМак»

119991 Москва, Ленинские горы, МГУ.

Тел.: (495) 939-2121, 647-2740, 932-9214. E-mail: info@biochemmack.ru, pcr@biochemmack.ru

www.biochemmack.ru

**ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В КОМБУСТИОЛОГИИ
(ПО ДАННЫМ НИЖЕГОРОДСКОГО ОЖОГОВОГО ЦЕНТРА)**

Алейник Д.Я.*, Арефьев И.Ю., Докукина Л.Н., Чарыкова И.Н., Соловьев Р.А.,
Стручков А.А, Сидорова Т.И.

ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

**daleynik@yandex.ru*

Комбустиология – раздел практической медицины, в котором давно и активно применяют клеточные технологии. Культивированные клетки кожи используют для лечения ожоговых и длительно незаживающих ран, для разработки эквивалентов кожи. В Российских ожоговых центрах культуры клеток интенсивно использовались, начиная с 1983 года с преобладанием технологий на основе культивированных фибробластов.

Материалы и методы. Клеточные трансплантаты на основе культивированных алофибробластов в Нижегородском ожоговом центре использовали с 1991 года. За 2012 - 2016 годы при лечении 830 пациентов с ожоговыми и донорскими ранами, трофическими язвами и длительно незаживающими ранами. Алофибробласты применяли при ожоговых ранах 3А и 3Б степени, при пограничных ожогах, при восстановлении донорских ран, при лечении обширных гранулирующих ран при недостатке донорских ресурсов кожи. Площадь поражения у пациентов составляла от 10% до 80% п.т. Площадь использованных трансплантатов - от 100 до 1500 см². В качестве матриц - носителей применяли различные покрытия синтетические и коллаген содержащие («Биокол», «Фолидерм» и т.д.). При обширных глубоких ожогах на основе метода, разработанного специалистами Института хирургии им. Вишневского, клеточные аллотрансплантаты сочетали с трансплантацией сетчатых аутооттрансплантатов 1: 4.

Культуры проверяются на стерильность, контаминацию микоплазмами и вирусами, фенотип культуры определяется с помощью проточной цитофлуориметрии («Navios» Beckman Coulter). По результатам исследований на каждую культуру составляется «паспорт культуры», отражающий данные обследования.

Клеточные трансплантаты применяются у пациентов, каждый из которых дал добровольное информированное согласие на использование клеточных технологий.

Применение культивированных алофибробластов приводит к изменению цитологической картины с воспалительной на воспалительно-регенераторную, затем на регенераторную и позволяет сократить сроки заживления ран на 2-6 дней, уменьшить выраженность рубцовообразования, сократить количество перевязок.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЛИМБА И СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА ДЛЯ ТЕРАПИИ ДИСФУНКЦИИ ЛИМБАЛЬНОГО ЭПИТЕЛИЯ

Александрова О.И.^{1*}, Хорольская Ю.И.¹, Гаврилук И.О.²., Писугина Г.А.^{1,3},
Журенков К.Э.^{1,3}, Машель Т.В.^{1,4}, Переплетчикова Д.А.^{1,4}, Дубовиков А.С.²,
Безушко А.В.², Чурашов С.В.², Черныш В.Ф.², Околов И.Н.⁵, Блинова М.И.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 2. ВМА им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия
 3. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
 4. ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
 5. Санкт-Петербургский филиал ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С. Н. Федорова» Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия
- *elga.aleks@gmail.com

В настоящее время считается, что поддержание постоянного обновления эпителиального покрова роговицы происходит благодаря делению, находящихся в складках палисад Vogt, лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК). Различные заболевания и повреждающие факторы могут привести к снижению функциональной активности ЛЭСК, их дефициту или полному отсутствию, в результате чего развивается патологическое состояние, получившее название лимбальной недостаточности (ЛН). Клинические проявления ЛН приводят к образованию сосудистого бельма и как следствие к прогрессирующему понижению остроты зрения. Одним из перспективных методов, позволяющих влиять на ход репарации роговицы при ЛН, является трансплантация тканеинженерных конструкций с культивируемыми стволовыми клетками. В качестве клеточной составляющей таких конструкций рассматривают стволовые клетки, полученные из различных источников. Цель настоящей работы состояла в изучении возможности использования стволовых клеток лимба и слизистой полости рта для терапии ЛН. Источником клеток служили фрагменты лимба цельных энуклированных глаз и биоптаты слизистой оболочки полости рта здоровых кроликов породы Шиншилла. Полученные и введенные в культуру *in vitro* популяции клеток использовали в качестве клеточного элемента при создании скаффолдов на основе коллагена I типа и амниотической мембраны (АМ). Созданные тканеинженерные конструкции трансплантировали кроликам с моделью лимбальной недостаточности. Полученные результаты показали, что примененные в эксперименте методики трансплантации разработанных тканеинженерных конструкций с культивируемыми стволовыми клетками лимба и слизистой полости рта обеспечивают восстановление нормального эпителиального покрова роговицы у кролика.

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

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА В СОСТОЯНИИ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО ПОКОЯ БОЛЕЕ УСТОЙЧИВЫ К ТЕМПЕРАТУРНОМУ ВОЗДЕЙСТВИЮ, ЧЕМ ПРОЛИФЕРИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ

Алексеевко Л.Л.^{1*}, Виноградов А.Е.¹, Анацкая О.В.¹, Шилина М.А.¹, Корниенко Ю.С.², Гринчук Т.М.¹, Никольский Н.Н.¹

1. *ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия*

2. *Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия*

* al.l@mail.ru

Состояние покоя – преобладающее состояние многих типов клеток в условиях гомеостаза. В живом организме стволовые клетки могут в течение длительного периода оставаться в состоянии покоя и начинают пролиферировать только в ответ на локальные сигналы повреждения. Основным препятствием на пути развития методов терапии, основанных на МСК, является низкая выживаемость клеток в месте повреждения. Ответ культивируемых МСК на стресс интенсивно изучается, однако удивительно мало известно о том, как покоящиеся клетки реагируют на изменения окружающей среды. Целью настоящего исследования является сравнение реакции на стрессовые воздействия пролиферирующих и покоящихся мезенхимных стволовых клеток (МСК). Мезенхимные клетки эндометрия человека (эМСК) были использованы в качестве взрослых стволовых клеток. эМСК были синхронизированы путем накопления клеток в фазе G₀/G₁ клеточного цикла при помощи сывороточного голодания в течение 30 часов. В качестве фактора стресса использовался сублетальный тепловой шок (ТШ). Покоящиеся и пролиферирующие эМСК нагревали при 45 °С в течение 30 мин, а затем возвращали в стандартные условия культивирования. Реакция на ТШ контролировалась ответом на повреждение ДНК, стресс индуцированным преждевременным старением (СИПС), пролиферативной активностью клеток и изменением окислительного метаболизма. Было обнаружено, что покоящиеся клетки быстрее восстанавливают повреждения ДНК, возобновляют пролиферацию и менее подвержены СИПС, чем пролиферирующие клетки. ТШ усиливал уровень АФК в пролиферирующих клетках, что сопровождалось повышением экспрессии генов, вовлеченных в антиоксидантную защиту, в отличие от покоящихся клеток. Результаты наших исследований показали, что покоящиеся клетки более устойчивы к тепловому стрессу, чем пролиферирующие. Функциональный анализ транскриптома выявил, что эМСК, пережившие тепловое воздействие, сохраняют высокую дифференцировочную способность и не подвержены трансформации.

Работа была поддержана Российским научным фондом (проект 14-50-00068).

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО НОСИТЕЛЯ ДЛЯ АДРЕСНОЙ ДОСТАВКИ МСК В ПОВРЕЖДЕННЫЙ СУСТАВ

Багаева В.В.^{1,3**}, Енукашвили Н.И.^{2*}, Золина Т.Л.¹, Котова А.В.^{1,3}, Елсукова Л.В.¹, Супильникова О.В.^{1,3}, Савинцев А.М.^{1,4}

1. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия
 2. ФГБУН Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 3. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
 4. СПб ГБУЗ «Городская Покровская больница», Санкт-Петербург, Россия
- *nie2424@yandex.ru
**bagvar@mail.ru

Введение. Локальные посттравматические повреждения хряща, а также дегенеративно-дистрофические повреждения хряща являются распространенным заболеванием. На данный момент не существует адекватного подхода, который обеспечивал бы полное и долговременное восстановление структуры и функциональной активности поврежденного сустава. Одним из перспективных подходов является использование биотрансплантатов на основе аутологичных хондроцитов или мезенхимных стромальных клеток, МСК. Для создания трансплантата нужной формы и консистенции, доставки клеток, удержания их на месте инъекции, создания оптимальной среды для роста МСК используются различные поддерживающие матрицы (т.н. скаффолды).

Цель исследования. Оценка влияния скаффолдов с разными физическими и химическими свойствами на пролиферативную активность, иммунофенотип, дифференцировочный потенциал аутологичных и донорских МСК.

Материалы и методы. МСК культивировали в течение 10 дней после заключения их в разрешенные к клиническому применению гидрогели на основе а) гиалуроновой кислоты (ГК), б) аутологичной обогащенной тромбоцитами плазмы (PRP), а также в) полимеризующийся гель – фибриновый клей - на основе обогащенных фибриногеном аутологичного или г) алогенного (из лишенной тромбоцитов плазмы пуповинной крови) криопреципитатов. Оценивали их влияние на иммуносупрессивные и пролиферативные свойства МСК, их иммунофенотип и способность к дифференцировке.

Результаты. В ходе работы показано отсутствие статистически значимого влияния всех четырех типов скаффолдов на оцениваемые морфо-функциональные характеристики клеток. При культивировании в данных скаффолдах не изменяется иммунофенотип МСК, пролиферативный потенциал, а также способность дифференцироваться в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлениях.

Выводы. Рассматриваемые материалы возможно использовать в качестве нейтральных скаффолдов для доставки МСК в поврежденный сустав.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ТКАНИ ПУПОВИНЫ НЕДОНОШЕННЫХ НОВОРОЖДЕННЫХ В КАЧЕСТВЕ ИСТОЧНИКА МСК ДЛЯ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ БРОНХОЛЕГОЧНОЙ ДИСПЛАЗИИ

Байзынова Я.М.^{1*}, Николаева И.Э.^{1, 2}, Киселева В.В.¹, Балашова Е.Н.³, Осипова Е.Ю.¹

1. Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва, Россия

2. Московский физико-технический институт, факультет биологической и медицинской физики, Москва, Россия

3 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии, перинатологии им. акад. В.И. Кулакова», Москва, Россия

*yanabayzanova@yandex.ru

Клеточная терапия открывает новые перспективы в лечении различных заболеваний. При некоторых патологиях, к примеру, бронхолегочной дисплазии новорожденных (БЛД), возможно применение МСК из пуповинной крови (ПК) или ткани пуповины (ТП). БЛД развивается практически у всех детей, рожденных до 34 недели гестации, через 3–4 недели после рождения и в большом проценте случаев ведет к инвалидизации выживших пациентов. Целью нашего исследования было проведение экспансии МСК из ПК, ТП недоношенных новорожденных разного гестационного возраста и их иммунофенотипическая (ИФТ) характеристика. Материалом исследования служили 9 образцов ПК (объемом 3–10 мл), 12 образцов ТП (размером 1–3 см³), полученных из НМИЦАГП им. В.И. Кулакова с письменным информированным согласием рожениц. Гестационный возраст новорожденных составлял 29–35 недель. Забор образцов проводился после отделения плаценты. Мононуклеарная фракция из ПК выделялась по стандартным протоколам на фиколе, ТП обрабатывалась механически на приборе GentleMACS Dissociator с предварительной инкубацией в 0,1% колагеназе в течение 30 минут при 37°C. Для культивирования МСК использовалась питательная среда StemMACS MSC Expansion Media. Экспансия длилась 4–5 недель в зависимости от динамики роста культуры с пассированием 1 раз в неделю. При ИФТ использовалась следующая панель антител: CD34PerCP, CD45PerCP; CD14PerCP, CD20PerCP, CD13FITC, HLA-DRPE, CD105PE, CD90FITC, CD73APC. В результате было выделено 12 образцов культур МСК из ТП. Экспансия МСК из ПК не была эффективной в связи с недостаточным количеством выделенных МСК и экспрессией маркеров МНС II класса HLA-DR. МСК из ТП соответствовали следующим критериям: адгезия к пластику, экспрессия поверхностных маркеров CD105, CD73 и CD90, при этом маркеры гемопоэтических клеток и клеток-предшественников CD34, CD45, CD14, CD20, CD13, HLA-DR отсутствовали. При экспансии МСК из ТП недоношенных новорожденных набирается достаточное количество клеток ($2-3 \times 10^6$ /кг веса тела пациента). Проведенное исследование показало целесообразность применения МСК из ткани пуповины для дальнейших клинических исследований клеточной терапии БЛД.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Балдуева И.А., Нехаева Т.Л., Новик А.В., Данилова А.Б., Даутов Д.Ф.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург,
Россия

biahome@mail.ru

Молекулярно-генетические подходы в изучении взаимодействия «иммунокомпетентная клетка – опухолевая клетка», механизмы реализации противоопухолевого иммунного ответа способствовали развитию новых стратегий клеточных технологий в онкологии и иммунотерапии рака.

В настоящее время изучаются: иммунобиологический надзор и противоопухолевый иммунный ответ, опухолевые клетки и их антигенные детерминанты, экспериментальные иммуногенетические модели, клиническая эффективность противоопухолевых вакцин нового поколения (активная специфическая иммунотерапия), высокотехнологичные иммунологические адьюванты, противоопухолевые вакцины в комбинации с хирургическими, химиотерапевтическими, иммунобиологическими, физическими факторами, инновационные методы оценки специфического поствакцинального иммунного ответа.

Многие исследования сфокусированы на проектировании, разработке и стандартизации рекомбинантных противоопухолевых вакцин, их сочетании со стандартными и новыми экспериментальными методами лечения. Использование рекомбинантных белков и вектор-опосредованных лигандов и/или цитокинов оказалось оптимальным для профилактики и лечения спонтанных опухолей у экспериментальных животных. Идентификация Т-клеточных опухолеассоциированных эпитопов и усиление иммуногенности эпитопов опухолеассоциированных антигенов способствовали разработке и клиническому изучению высокотехнологичных вакцин нового поколения.

Иммуногенность и иммуносупрессия, анергия и толерантность – основные постулаты в изучении противоопухолевого иммунитета и создании противоопухолевых вакцин в настоящее время приобрели особое значение в связи иммуногенетическим анализом пассируемых клеточных культур первичных и метастатических злокачественных опухолей человека.

Важным этапом изучения противоопухолевого иммунитета и эффективности клеточной иммунотерапии у больных злокачественными новообразованиями становится оценка вариабельности антигенов главного комплекса гистосовместимости I класса (HLA-A, -B, -C) и II класса (HLA-DP, -DR, -DQ),

представляющих опухолеассоциированные антигены (ОАА) CD4⁺ и CD8⁺Т-эффекторам гиперчувствительности замедленного типа.

Достижения в изучении иммунологических аспектов рака и прогресс противоопухолевой иммунотерапии вселяет надежду на успех вакцинотерапии мезенхимальных новообразований. Этому способствует изучение наиболее перспективных иммунотерапевтических мишеней, таких как раково-тестикулярные антигены, иммуногенность которых установлена для меланомы кожи и других злокачественных новообразований, а также для отдельных подтипов сарком.

Разработка отечественных инновационных противоопухолевых вакцин на основе аутологичных опухолеспецифических дендритных клеток (ДК), обладающих безопасностью и эффективностью, отвечает задачам стратегической импортзамещающей программы Правительства РФ. Обеспечение надлежащего качества отечественных вакцин на основе ДК предполагает стандартизацию и оптимизацию рекомендованных методик.

Адьювантная (профилактическая) терапия больных меланомой кожи III стадии относится к клинической стратегически важной и нерешенной до сих пор задаче. С этой точки зрения иммунотерапия с использованием вакцин на основе аутологичных ДК является перспективным методом лечения, использование которого в настоящее время обосновано экспериментальными и клиническими исследованиями.

Иммунотерапия костномозговыми незрелыми предшественниками ДК, сенсibilизированными фотомодифицированными опухолевыми клетками *in vivo*, является перспективным методом лечения, который в экспериментальных исследованиях стимулирует иммунные реакции организма до уровня, достаточного для элиминации опухоли.

Изучение механизмов активации и иммунорегуляции «наивных» Т-клеток, Т-клеток памяти, антигенов главного комплекса гистосовместимости, костимулирующих сигналов антигенпрезентирующих клеток и их оптимизация в экспериментальных доклинических исследованиях расширили перспективное направление противоопухолевой иммунотерапии – вакцинотерапии на основе «высокопрофессиональных» антигенпрезентирующих ДК. Апробируются новые мишени для вакциноопосредованной иммунотерапии ДК.

Рекомбинантные векторы, содержащие трансгенные ОАА и Т-клеточные костимулирующие молекулы (B7.1, ICAM-1, LFA-3), использование GM-CSF и/или анти-CTLA-4, PD-1, PD-L1 моноклональных антител способствовали увеличению функциональной активности противоопухолевых Т-лимфоцитов и разрушению привитой опухоли. Эти подходы получили развитие в клинических исследованиях и клинической практике.

Иммунологический синапс (ИС), образуемый Т-клетками при распознавании ОАА, становится важной характеристикой эффективности противоопухолевой иммунотерапии. Увеличение числа ИС при внутриопухолевом введении вакцин свидетельствует о преимуществе данного способа активации противоопухолевого иммунного ответа. Вместе с тем системное введение клеточных вакцин, в ряде случаев обладает сопоставимой клинической эффективностью с молекулярно-генетической таргетной терапией и требует дальнейшего изучения.

Отдельные цитостатики, гормоны, моноклональные антитела, цитокины, таргетные препараты, используемые в оказании стандартной медицинской помощи, вызывают интерес в реализации противоопухолевого иммунного ответа в дозах и режимах, не предусмотренных стандартами, но обусловленных клинической реальностью (уменьшение дозы, изменение режима и т.п.). Например, низкие дозы циклофосфида изменяют число и функциональную активность периферических Т-регуляторных клеток. Интерес к этому феномену сохраняется в течение последних десятилетий и остается недостаточно ясным в настоящее время.

Таким образом, изучение молекулярно-генетических аспектов регуляции противоопухолевого иммунитета в контексте создания и клинического применения противоопухолевых вакцин становится приоритетным направлением клеточных технологий в онкологии XXI века.

КЛЕТочная ТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Хубулава Г.Г., Белый С.А.*, Немков А.С., Комок В.В., Лукашенко В.И., Буненков Н.С., Бабенко Е.В.

ПСПбГМУ им. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

*sabel1968@mail.ru

Актуальность. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является печальным исходом многих заболеваний сердечно-сосудистой системы. Несмотря на серьезные успехи в ее лечении количество новых случаев ХСН тревожно растет и грозит стать настоящей пандемией. Это требует разработки новых методов лечения этого состояния.

Цель работы. Оценить эффективность интракоронарного введения аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга (АМФКМ) у больных с ХСН как исход ишемической болезни сердца (ИБС) и дилатационной кардиомиопатии (ДКМП).

Материал и методы. Всего в исследование было включено 82 пациента с ХСН как исход ИБС. В группу клеточной терапии вошло 60 человек. В группу контроля - 22 пациента, которые достоверно не отличались по основным параметрам от пациентов группы наблюдения. Исходно всем пациентам выполнялись эхокардиография (ЭХОКГ), нагрузочные тесты, сцинтиграфия миокарда (ОФЭКТ), позитронно-эмиссионная томография (10 человек). Качество жизни оценивалось с помощью опросника SF 36 и миннесотского опросника качества жизни. Также нами наблюдались 21 пациент с ХСН как исход ДКМП. Группа контроля - 10 человек. Исходно всеми пациентами выполнялись: эхокардиография (ЭХОКГ), тест с 6-минутной ходьбой, ОФЭКТ (5 человек). Судьба больных с ХСН после клеточной терапии отслеживалась в период до 10 лет.

Результаты и обсуждения. У больных с ХСН в группе клеточной терапии отмечалось достоверное уменьшение размеров левого желудочка (ЛЖ) и улучшение систолической функции. Происходили процессы «обратного» ремоделирования ЛЖ. Важно отметить, что указанные положительные изменения регистрировались в течение длительного времени (до 3-5 лет) после однократного применения АМФКМ. Достоверное увеличение объема жизнеспособного миокарда было установлено по данным ПЭТ. Также отмечалось достоверное увеличение перфузии миокарда по данным ОФЭКТ. Улучшение показателей сократимости, перфузии и жизнеспособности миокарда положительно коррелировало с увеличением толерантности к физической нагрузке и уменьшением функционального класса ХСН. Эти позитивные изменения привели к достоверному улучшению 5-летней выживаемости пациентов после клеточной терапии и тенденцией к улучшению 10-летней выживаемости.

Заключение. Клеточная терапия (интракоронарное введение АМФКМ) является эффективным и безопасным методом лечения ХСН разной этиологии и может использоваться у пациентов в сочетании с методами лечения с уже доказанной пользой.

ПЕРЕПРОГРАММИРОВАНИЕ ЗРЕЛЫХ АДИПОЦИТОВ КРЫС ПОД ДЕЙСТВИЕМ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

Белякова М.Б.*, Костюк Н.В., Черноруцкий М.В., Миняев М.В., Лещенко Д.В.,
Калинкин М.Н.

Тверской ГМУ, Тверь, Россия

*mayabe@yandex.ru

Превращение первичных зрелых адипоцитов в дедифференцированные фибробластоподобные клетки, обладающие мультипотентными свойствами, производится различными методиками, общими условиями которых является применение бедных сред и сывороток взрослых животных. Перепрограммирование адипоцитов на остеогенез предоставило бы перспективный инструмент для регенеративной медицины. В данной работе изучалось воздействие метаболитических факторов на перепрограммирование *in vitro* клеток первичных культур из жировой ткани. Для этого выделялись зрелые адипоциты крыс, при потолочном культивировании в среде без добавления гормонов добивались их перехода в фибробластоподобную форму и последующей пролиферации. Дальнейшее культивирование осуществлялось в средах, традиционно используемых для адипогенной и остеогенной дифференцировки в искусственных условиях, с применением 10% бычьей сыворотки, но без обычного добавления гормонов-индукторов, тогда как к контрольным культурам индукторы (IBMX, дексаметазон, инсулин) добавляли. Верификацию индукции проводили окрашиванием ORO или ализариновым красным. В среде DMEM с высокой глюкозой адипогенная индукция наблюдается на 20-30% меньше по числу клеток, чем при постоянной стимуляции инсулином, при этом в средах с низкой глюкозой процент индуцированных клеток незначителен, лишь 1-2% от всей популяции. В среде DMEM с аскорбатом и глицерофосфатом кальция больше процент индуцировавшихся по остеогенному пути клеток в случае культивирования с низкой глюкозой, причем добавление дексаметазона незначительно увеличивает число остеоцитов в соответствующей среде. Таким образом, обеднение среды переводит адипоциты в мультипотентное состояние. На этапе дифференцировки метаболитические факторы (глюкоза и фосфат) оказываются более важными, нежели системные организменные регуляторы (в частности гормоны). Механизмы действия метаболитических факторов могут быть связаны с индукцией процесса дифференцировки непосредственно или через собственные метаболиты, а также с переключением локальных сигнальных систем.

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ СОЗДАНИЯ ГЕНО-МОДИФИЦИРОВАННОГО КЛЕТОЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ПОВЕРХНОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ КРУПНЫХ СУСТАВОВ

Божокин М.С.^{1*}, Божкова С.А.¹, Рубель А.А.^{2.}, Качкин Д.В.², Нашекина Ю.А.³

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

2. Научная Лаборатория Биологии Амилоидов, СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

3. ФГБУН Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*writeback@mail.ru

Введение. Повреждения гиалинового слоя суставной поверхности являются чрезвычайно актуальной проблемой во всем мире. Несмотря на многочисленные способы восстановления хрящевой поверхности, эффективного решения данной проблемы до сих пор не найдено, в том числе и из-за отсутствия способности гиалинового хряща к регенерации. Перспективным направлением является создание и трансплантация генно-модифицированных клеточно-инженерных конструкций (КИК) в область повреждения гиалинового слоя с последующей интеграцией в неповреждённый хрящ.

Цель исследования. Оценить в эксперименте промежуточные результаты создания генно-модифицированной клеточно-инженерной конструкции для замещения дефектов гиалинового хряща.

Материалы и методы. Клеточную культуру выделяли из бедренных костей половозрелых крыс, подтверждение фенотипа ММСК проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Aria III с использованием моноклональных антител CD45 и CD90. Биodeградируемые матрицы готовили методом вспенивания из полилактида. Плазмиды для трансфицирования конструировали на основе вектора pCDNA3.1. Совмещение культуры клеток проводили динамическим способом под действием избыточного давления N₂ в разработанном устройстве.

Результаты. При анализе клеточной культуры на проточном цитофлуориметре было установлено содержание не менее 96,6% CD45-, CD90+ клеток. С помощью секвенирования была подтверждена последовательность созданных плазмид, содержащих гены *sox9*, *tgfb3* и флуоресцентного белка. Под действием динамического заселения культуры клеток и биodeградируемого носителя было получено равномерное распределения ММСК внутри пористой полилактидной матрицы.

Заключение. Разработанная методика получения, динамического совмещения клеток и биodeградируемого носителя позволила получить КИК. Методами молекулярного клонирования удалось создать требуемые генетические конструкции, однако, требуются дополнительные исследования, направленные на разработку эффективной методики трансфицирования культуры ММСК.

ПРИМЕНЕНИЕ АЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ОБШИРНЫМИ ОЖОГАМИ

Вагнер Д.О.^{1*}, Зиновьев Е.В.¹, Солошенко В.В.¹, Крылов П.К.¹, Костяков Д.В.¹, Юркевич Ю.В.², Блинова М.И.³, Енукашвили Н.И.³

1. НИИ скорой помощи им. И.И. Джanelидзе, Санкт-Петербург, Россия

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

3. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*77wagner77@mail.ru

Введение. Современные биотехнологические методы восстановления кожного покрова являются важным элементом комплексного лечения пострадавших с обширными ожогами.

Цель исследования: Оценить результаты клинического применения геля с алогенными фибробластами у пострадавших с тяжелой термической травмой.

Материал и методы исследования. Истории болезни 34-х пострадавших, госпитализированных в отделение ожоговой реанимации НИИ скорой помощи им. И.И. Джanelидзе в период с 2015 г. по 2018 г. В соответствии с показаниями для применения биоматериала пациенты были разделены на четыре группы:

1. Стимуляция эпителизации ожогов IIIa степени (n=10).
2. Стимуляция эпителизации перфорационных ячеек трансплантатов (n=14).
3. Сокращение срока заживления донорских ран (n=6).
4. Ускорение роста грануляций после выполнения некрэктомии (n=4).

В качестве биоматериала использовали полученные из крайней плоти доноров 1-3 лет фибробласты дермы, культивированные *in vitro*, в гелеобразующем полимере гидроксипропилцеллюлозы (ООО «Покровский банк стволовых клеток») или желированном коллагене I типа (Институт цитологии РАН).

Результаты исследования. У 70% пациентов I группы к 5-м суткам от момента аппликации геля с фибробластами выявлены участки новообразованного эпидермиса, которые в дальнейшем увеличились в размерах и сформировали единый эпидермальный регенерат. У 93% пострадавших II группы зафиксирована тотальная эпителизация перфорационных ячеек приживших трансплантатов на 7-9 сутки после операции. В третьей группе исследования длительность эпителизация была сопоставима со стандартной методикой лечения донорских ран. В последней группе использование клеточных технологий позволило восстановить кожный покров на 9-11 сутки после трансплантации фибробластов в 75% случаев.

Вывод. Результаты нашего исследования свидетельствуют о том, что наибольший положительный эффект от трансплантации алогенных фибробластов можно ожидать у пострадавших с обширными пограничными ожогами и пациентов, перенесших аутодермопластику сетчатыми трансплантатами с высоким коэффициентом пластики.

ОПЫТ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ОКАЗАНИЯ ПОМОЩИ ОЖГОВЫМ ПАЦИЕНТАМ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Гилевич И.В.*, Федоренко Т.В., Коломийцева Е.А., Богданов С.Б., Поляков И.С.,
Порханов В.А.

*ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1
им. проф. С.В. Очаповского» Минздрава Краснодарского края, Краснодар, Россия
giliv@list.ru

В 2018г. ожоговый центр ГБУЗ «НИИ-ККБ №1» отпраздновал 45 лет с момента начала оказания помощи пациентам, пострадавшим от ожоговой травмы. Результатом долгой работы центра стало формирование принципов оказания помощи населению Краснодарского края, которое включает в себя моментальное оповещение ожогового центра центральными районными больницами о пострадавших, их ранний перевод на специализированные койки ГБУЗ «НИИ-ККБ №1», выполнение раннего хирургического лечения только в ожоговом центре, в том числе детскому населению края; выполнение аутопластик взрослому населению края в районах на площади до 3% только после согласования с ожоговым центром. Ежегодно в Краснодарском крае выполняется до 2000-2200 операций, из них до 95% в ожоговом центре. Сформированы принципы реанимационного ведения пациентов, в том числе и проведения экстракорпоральных детоксикационных методов лечения. Одним из достижений в лечении ожоговых пациентов являются способы закрытия раневых поверхностей. Помимо проведения аутопластики перфорированным кожным лоскутом были разработаны и запатентованы способы пластики полнослойным кожным лоскутом, внедрена пластика с помощью МЕЕК-технологии. Благодаря этим принципам отмечается снижение общей летальности до 6%. Для лучшей адаптации кожного лоскута, а также в случаях дефицита донорских участков при ожогах большой площади, при пластике по МЕЕК-технологии в рамках ограниченного клинического исследования были использованы фибробласты, культивированные по стандартной методике в лаборатории с соблюдением правил GMP. Нами были использованы культуры аутологичных фибробластов, как во взвеси, так и на полимерном носителе, в зависимости от показаний. Результаты лечения показали, что скорость заживления раны сокращается в 2 раза. При выполнении полнослойной кожной пластики в сочетании с использованием аутологичных фибробластов полная адаптация кожного лоскута отмечалась на 6-й день, по сравнению со случаями использования полнослойной кожной пластики без клеточной терапии, где адаптация была на 12-е сутки.

Таким образом, в развитии современной комбустиологии начинают приобретать огромное значение не только совершенствование хирургической тактики, но и разработка персонализированного подхода с использованием клеточной терапии.

ОСТЕОГЕНЕЗ И АНГИОГЕНЕЗ В СФЕРОИДАХ ИЗ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

Горкун А.А.^{1, 2, 3, *}, Зурина И.М.^{1, 2, 3}, Кошелева Н.В.^{1, 2, 4}, Устинова Е.Е.¹, Репин В.С.¹, Сабурова И.Н.^{1, 2}

1. ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия
 2. ФГБОУ ДПО Российская медицинская Академия непрерывного профессионального образования, Москва, Россия
 3. Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия
 4. Биологический факультет ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
- *stgork@gmail.com

В настоящее время при создании биоэквивалентов для реконструкции дефекта костной ткани большого объема лимитирующим фактором остается васкуляризация, значительно влияющая на жизнеспособность и функциональную активность клеток. Поэтому актуально создание новых способов получения васкуляризованной костной тканеинженерной конструкции. Как известно, 3D культивирование стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) в виде сфероидов является «мостом» между монослойной культурой клеток и полноценной тканью (Pampaloni *et al.*, 2007): в сфероиде образуется микроокружение, способствующее более эффективной дифференцировке, в том числе в ангиогенном (Gorkun *et al.*, 2018) и остеогенном направлении (Gurumurthy *et al.*, 2017). Однако ранее анализировали сфероиды, индуцированные к дифференцировке лишь в одном направлении. Целью данной работы стало изучение единовременной индукции ангиогенеза и остеогенеза в сфероиде из СКЖТ человека.

В работе исследовали сфероиды из СКЖТ после индукции в двух направлениях дифференцировки (ангио- и остеогенном) и после монодифференцировки. Контрольную группу составляли неиндуцированные сфероиды. На 7, 14 и 21 сут культивирования в сфероиде анализировали экспрессию маркеров ангиогенеза (CD31, Flk-1) и остеогенеза (остеокальцин, остеопонтин).

На 7 сут поверхностные клетки в сфероиде начинали экспрессировать остеопонтин, также появлялись CD31+/Flk-1+ клетки, присутствовавшие и на 14 и 21 сут. На 14 сут в отдельных клетках сфероида появлялась экспрессия остеокальцина, количество таких клеток увеличивалось к 21 сут. Установлено что

неиндуцированные сфероиды обладали способностью к частичному спонтанному остеогенезу, но число дифференцированных клеток было ниже, чем при остеоиндукции. Единовременная индукция привела к васкулогенезу в сфероидах и к более раннему появлению большого числа остеокальцин+ клеток. Полученные сфероиды были стабильны и представляли собой прототип васкуляризованной микрооткани.

Создание биоинженерных конструкций нового поколения с использованием остеопластических материалов и индуцированных в ангиогенном и остеогенном направлении сфероидов из СКЖТ открывает новые перспективы для разработки инновационных технологий получения биоэквивалентов васкуляризованных фрагментов костной ткани *in vitro* для быстрого и эффективного восстановления крупных дефектов костей осевого скелета или лица.

АЛОГЕННЫЕ МОБИЛИЗОВАННЫЕ СТВОЛОВЫЕ КРОВЕТВОРНЫЕ КЛЕТКИ: СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТРАНСПЛАНТАЦИИ У ДЕТЕЙ С ОНКОГЕМАТОЛОГИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

Гривцова Л.Ю.¹, Тупицын Н.Н.²

1. МРНЦ им А.Ф. Цыба – филиал НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Россия

2. НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, Россия
grivtsova@mail.ru

Субпопуляции аллогенных мобилизованных стволовых кроветворных клеток (СКК) были изучены в 61 образце (продукт лейкафереза) у 50 здоровых лиц. СКК были получены с целью аллогенной трансплантации в детской онкологии. В работе изучены следующие субпопуляции СКК: CD45 –, CD38 –HLADR , CD90, CD117, CD13, CD33, CD71, CD61, CD19, CD7, CD56. Оценена эффективность мобилизации отдельных субпопуляций СКК у здоровых лиц на фоне стимуляции кроветворения ростовыми факторами в монорежиме (Г-КСФ). Впервые проанализировано возможное влияние качественного состава аллогенных мобилизованных стволовых кроветворных клеток (субпопуляционный состав CD34+ трансплантируемых клеток и популяций лимфоцитов) на эффективность проведения процедуры аллогенной трансплантации у онкологических больных детского возраста.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОМ ВНЕКЛЕТОЧНОМ МАТРИКСЕ В БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕДАХ

Григорьева О.А.*, Кузнецова Е., Александрушкина Н.А., Ефименко А.Ю.

*Институт регенеративной медицины МНОЦ МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия*

**go.grigorievaolga@gmail.com*

Использование бессывороточных сред представляет несомненный интерес для разработки клеточных продуктов для регенеративной медицины. Однако культивирование клеток в отсутствие сыворотки может приводить к снижению пролиферации и выживаемости клеточной линии, вызванной, в частности, недостаточной адгезией клеток к субстрату. Применение внеклеточного матрикса в качестве подложки для культивирования могло бы решить эту проблему. Мы считаем, что наиболее физиологичная архитектура и состав матрикса сохраняется в результате разработанной нами технологии децеллюляризации клеточного пласта, собранного из мезенхимных стромальных клеток человека. Для получения пласта была использована линия ASC52telo (hTERT immortalized adipose derived Mesenchymal stem cells (ATCC® SCRC-4000™)). Децеллюляризация собранного пласта производилась с использованием раствора детергента с последующей обработкой ДНК-азой. При культивировании первичной линии МСК из жировой ткани человека на полученном матриксе в бессывороточной среде CTS™ StemPro™ MSC (Thermo Scientific), клетки сохраняли фибробластоподобную морфологию и равномерно распределялись по поверхности по сравнению с контролем на пластике, где клетки собирались кластерами и формировали сфероидоподобные структуры. Кроме того, при культивировании на децеллюляризованном ВКМ клетки сохраняли способность к пролиферации при пассировании. Полученные данные позволяют предположить, что децеллюляризованный ВКМ создает физиологичные условия для культивирования первичных линий клеток *in vitro*. Дополнительным преимуществом такого подхода является возможность создания аутологичного матрикса, что позволяет исключить использование ксеногенных и аллогенных компонентов для культивирования и связанные с ним риски.

Проточные цитометры фирмы Beckman Coulter

Иммунофенотипирование, диагностика лейкозов и лимфом, анализ стволовых клеток, определение минимальной остаточной болезни, аллергодиагностика лекарственной непереносимости, определение стадий апоптоза, исследование клеточного цикла.

- Встроенный контроль качества
- Программные приложения для полностью автоматического анализа
- Полная цветовая компенсация

Проточный цитометр Navios™

Комплектация двумя или тремя лазерами, измерение до 10 цветов одновременно
Производительность до 80 образцов/час
Широкий динамический диапазон регистрации сигналов (до 6 декад)

Проточный цитометр CytoFLEX™

До 13-ти флуоресцентных каналов
Инновационный подход к компенсации
Абсолютный счет
Множество конфигураций: от 1 до 3 лазеров и от 4 до 13 цветов
Минимальный расход образца
Компактность; быстрая установка

Реагенты Beckman Coulter для проточной цитометрии

Готовые наборы реагентов для проведения иммунологических и онкогематологических исследований, выявления стволовых клеток и исследования функциональной активности клеток
Антитела и сопутствующие реагенты для выявления поверхностных и внутриклеточных антигенов
Широкий выбор антител, конъюгированных с различными флуорохромами для научных и клинических исследований



ООО «ЛабТэк»

Авторизованный дилер компании Beckman Coulter Int. S.A.
191186, г. Санкт-Петербург, а/я 238
тел.: (812) 313-02-03;
факс: (812) 313-02-04
www.labtech.su



ООО «ЛабТэк» предлагает новые решения на пути повышения эффективности лабораторных исследований.

Компания осуществляет поставку лабораторного оборудования и реактивов ведущих зарубежных компаний:

- Оборудование **Beckman Coulter** для клинической лабораторной диагностики и медико-биологических научных исследований: гематологические, иммунохимические, биохимические анализаторы, анализаторы мочи; проточные цитофлуориметры; центрифуги; анализаторы количества и размера частиц; лабораторные роботы.
- Оборудование для экспресс-лабораторий **IL Werfen**: анализаторы газов крови и электролитов; приборы и реагенты для исследования системы гемостаза.
- Широкий спектр пластиковой лабораторной посуды **Sarstedt**: системы взятия венозной и капиллярной крови; готовые пробирки; контейнеры для биологических образцов; расходные материалы для бактериологии, культивирования клеток, ПЦР-диагностики; наконечники для автоматических пипеток.

Деятельность компании «ЛабТэк» направлена на создание эффективно функционирующего лабораторного комплекса, отвечающего потребностям специалистов сегодня и в будущем. Организация стремится учитывать всю сферу деятельности заказчиков и их ежедневные запросы, прочные связи с компаниями-производителями позволяют поддерживать доступные и гибкие цены на продукцию высокого качества.

ООО «ЛабТэк» обеспечивает поставку, установку и техническое обслуживание приборов, а также обучение специалистов современным методикам, способствуя внедрению передовых лабораторных технологий. За 25 лет своей работы организация сумела занять достойное место на отечественном рынке лабораторных технологий.

ООО «ЛабТэк»

Передовые лабораторные технологии

191186, Россия, г. Санкт-Петербург, а/я 238

Тел.: +7 (812) 313-02-03

info@labtech.su / www.labtech.su

EXTRACELLULAR VESICLES RELEASED BY NEURAL CREST-DERIVED STEM CELLS AS A NOVEL APPROACH TO STIMULATE ALVEOLAR BONE REGENERATION

Grimm W.-D.^{1,2}

1. *Department of Dental Medicine, Faculty of Health, Witten/Herdecke University, Germany*

2. *Stem Cell Lab, Institute of Regenerative Medicine, Stavropol State Medical University, Russia*

The bone has an intrinsic capacity to regenerate itself. However, if the lesion size or degree of degeneration is too severe to be regenerated via endogenous repair mechanisms, the use of stem cells provides an elegant and promising way to replace the lost tissue or to boost the organism's regenerative capacity. Importantly, several adult progenitor and stem cell types have been described to be able to generate bone cells. This includes osteoblast progenitor cells, mesenchymal stromal cells (MSCs) of different origin and adult neural crest-derived stem cells (NCSCs). Thus, all those cell type could be potentially applied to regenerate bone tissue after transplantation via engraftment, differentiation and functional integration. Notably, in addition to this direct contribution, stem cells like MSCs and NCSCs can contribute to tissue repair through secretion of paracrine factors that mediate anti-inflammation, immunomodulation and boost endogenous regeneration. This paracrine mode of action is nowadays widely believed to be at least partly mediated by a release of extracellular vesicles (EVs) with anti-inflammatory and immunomodulatory proteins and miRNA as their primary cargo. In this lecture, basic EV biology will be discussed in addition to specific application of NCSC-derived EV in bone regeneration in preclinical models.

ДЕЛЕЦИЯ УЧАСТКА X-ХРОМОСОМЫ, СОДЕРЖАЩЕГО КЛАСТЕР МИКРОРНК, НАРУШАЕТ ПРОЦЕСС РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ СОМАТИЧЕСКИХ КЛЕТОК КРЫСЫ К ПЛЮРИПОТЕНТНОМУ СОСТОЯНИЮ

Давлетшина Г.И.^{1, 3*}, Шерстюк В.В.^{1, 2, 3, 4}, Вяткин Ю. В.^{1, 2, 5, 6}, Штокало Д. Н. ^{1, 5, 6, 7}
Закиян С.М.^{1, 2, 3, 4}

1. *ФГБНУ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
 2. *Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия*
 3. *ФГБУ «СФБИЦ им. ак. Мешалкина» Минздрава России, Новосибирск, Россия*
 4. *ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия*
 5. *ООО «АкадемДжин», Новосибирск, Россия,*
 6. *Институт Сен-Лорана, Вобурн, США,*
 7. *Институт систем информатики им. А.П. Ершова СО РАН, Новосибирск, Россия.*
- *davlet15628@gmail.com

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – это стволовые клетки, полученные из соматических клеток взрослого организма в процессе их репрограммирования к плюрипотентному состоянию. ИПСК способны дать начало производным всех трех зародышевых листков, что представляет огромный интерес для биомедицины. Процесс репрограммирования с помощью основных факторов плюрипотентности Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc является достаточно хорошо изученным, однако существуют и другие способы получения ИПСК, например, при помощи некоторых микроРНК. МикроРНК – это малые некодирующие РНК, длиной 18-25 нуклеотидов, которые участвуют в посттранскрипционной регуляции экспрессии генов. У человека и мыши открыто огромное количество микроРНК, некоторые из которых участвуют в репрограммировании к плюрипотентному состоянию, что было подтверждено при помощи их сверхэкспрессии в различных соматических клетках этих двух организмов. Не менее важным объектом для изучения ИПСК является крыса, так как на крысе проводят большинство физиологических и фармакологических исследований. Однако микроРНК крысы, а в частности микроРНК, участвующие в репрограммировании соматических клеток крысы, практически не изучены. Более того, соматические клетки крысы в качестве модели для изучения микроРНК, участвующих в процессе репрограммирования к плюрипотентному состоянию, никто не использовал.

Ранее мы обнаружили, что группа микроРНК, расположенная на X-хромосоме крысы дифференциально экспрессируется в ПСК по сравнению с фибробластами. Мы выдвинули гипотезу, что данная группа микроРНК участвует в

процессе репрограммирования к плюрипотентному состоянию, либо в поддержании плюрипотентности клетки. Для ее подтверждения мы делетировали участок, в котором расположены исследуемые микроРНК в фибробластах самца крысы при помощи системы CRISPR/Cas9, и репрограммировали полученные клетки к плюрипотентному состоянию. В результате эффективность репрограммирования в клетках с делецией этого участка значительно снижается, а морфология полученных колоний заметно отличается от морфологии колоний, полученных в контроле и истинных ПСК. Более того, жизнеспособность полученных в процессе репрограммирования клеток зависит от экзогенной экспрессии основных генов плюрипотентности.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10084.

ОЦЕНКА УРОВНЯ АКТИВАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК СЕРДЦА ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОКСИИ *IN VITRO*

Докшин П.М.^{1,2}, Малашичева А.Б.^{1,2*}

1. ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

2. ФГБОУ ВПО «СПбГУ», Санкт-Петербург, Россия

*amalashicheva@gmail.com

Сердце взрослого человека не способно к функционально значимой регенерации, и при повреждении происходят необратимые процессы клеточного замещения и ухудшения сократительной функции миокарда. Восстановление сердечной мышцы после острого инфаркта является актуальной проблемой современной регенеративной медицины. Недавно было показано, что в периинфарктной зоне миокарда присутствуют активно пролиферирующие клетки. Это наблюдение способствовало рассмотрению роли гипоксии в качестве возможного фактора активации регенеративного потенциала сердца. Однако, молекулярные механизмы, лежащие в основе репаративных процессов, остаются неясными. Было показано, что сигнальный путь Notch принимает участие в эмбриональном развитии сердца, а также в поддержании гомеостаза тканей в постнатальном периоде. Кроме того, Notch играет ключевую роль в процессах регенерации тканей в организме. Поиск соответствующих факторов, ответственных за активацию регенеративных возможностей сердца, имеет решающее значение для понимания механизмов регенерации и формирования терапевтических стратегий в лечебной практике.

Целью нашей работы является сравнение уровней активации мезенхимальных клеток сердца (МКС) в зависимости от времени пребывания в гипоксическом стрессе.

В работе были использованы МКС, полученные из желудочков сердца здоровых крыс линии Вистар. Индукция активации проводилась на модели гипоксии *in vitro*. Уровни экспрессии генов интереса оценивали при помощи метода ПЦР в реальном времени.

Мы показали повышение уровней экспрессии генов: *Notch1*, *Runx2* и *Hes1* и выявили точки активации на временной шкале.

Таким образом, гипоксическое воздействие имеет влияние на активацию эндогенного регенеративного потенциала мезенхимальных клеток сердца.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: МИОГЕННЫЕ ПОТЕНЦИИ И УЧАСТИЕ В РЕГЕНЕРАЦИИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ

Домарацкая Е.И., Буторина Н.Н., Паюшина О.В., Шевелёва О.Н.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, ул. Вавилова, д.26,
Москва, Россия

*edomar@mail.ru

Данные последних лет показывают, что стимуляция регенерации мышц может быть достигнута при введении МСК в область повреждения (Winkler *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2015). Рассматриваются три механизма их участия в регенерации скелетных мышц – дифференцировка в миогенном направлении, слияние с миобластами и паракринное влияние на миогенез. Однако сведения об участии МСК в миогенной дифференцировке противоречивы. Мы исследовали возможную дифференцировку МСК непосредственно в миогенные клетки и их паракринное влияние на миогенез. При культивировании МСК с индукторами миогенеза (дексаметазон и азацитидин) и в присутствии факторов, выделяемых мышечными клетками, МСК в миогенном направлении не дифференцировались. Напротив, когда эффекторными клетками оказывались мышечные клетки, МСК активировали миогенез – число миотуб увеличивалось. При культивировании мышечных клеток в среде, кондиционированной МСК, число миотуб также возрастало. Эксперименты с МСК, мечеными GFP, показали, что МСК имеют слабую способность к слиянию с миобластами. В опытах *in vivo* на модели совместного подкожного введения МСК и клеток из разрушенных мышц МСК стимулировали ранние стадии восстановления: миотубы образовывались раньше, их размеры и число увеличивались, активировался ангиогенез. Через 14 суток после введения в поврежденную мышцу МСК способствовали формированию более зрелых мышечных волокон, число сосудов увеличивалось, снижалась частота фиброза. Благоприятное влияние МСК на регенерацию мышечной ткани, очевидно, связано с их паракринной функцией, т.к. многократное введение кондиционированной ими среды или среды после лиофилизации, повышающей концентрацию ее содержимого, уменьшало воспаление и активизировало ангиогенез.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» №0108-2018-0013.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИСХОДЫ ПОЛУШАРНОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА ФОНЕ ПРИМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАТА ЯДРОСОДЕРЖАЩИХ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Дубинина Е.А.^{1*}, Аврамишина Я.Б.¹, Алферова Ю.С.¹, Петриков С.С.¹, Яковченко Н.А.², Романов Ю.А.²

1. Государственное бюджетное заведение города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, Россия

2. ООО «КриоЦентр», Москва, Россия

*dubinina.ea@mail.ru

Введение. В течение последних десятилетий проблема острого инсульта приобретает все большую значимость в связи с широкой распространенностью цереброваскулярной патологии, высоким уровнем летальности, частым развитием инвалидности и социальной дезадаптацией перенесших его больных. В настоящее время открылись новые перспективы в улучшении функционального исхода инсульта благодаря клеточным технологиям. В экспериментальных моделях инсульта клетки пуповинной крови обладают способностью восстанавливать поврежденные нервные клетки и влиять на функциональное улучшение состояния.

Цель исследования. Оценить безопасность внутривенного применения концентрата ядросодержащих клеток пуповинной крови и функциональные исходы ишемического инсульта на фоне клеточной терапии.

Материалы и методы. В исследование были включены 18 пациентов с ишемическим инсультом в каротидном бассейне, которые были распределены на две группы. Пациентам основной группы (n=6, средний возраст 51±3, средний балл по NIHSS 11) на 7-14-28-42 сутки от начала развития заболевания проводилось четырехкратное внутривенное капельное введение концентрата клеток пуповинной крови. Пациенты контрольной группы (n=12, средний возраст 58±9, средний балл по NIHSS 12) получали только "стандартную" терапию. Проводилась оценка результатов по шкале инсульта Национального института здоровья США (NIHSS), Индексу Бартела (ИБ), Модифицированной шкале Рэнкина (мШР).

Результаты. На 30 сутки средний балл по NIHSS в основной и в контрольной группах составил 6±2 и 8±6 соответственно. Количество пациентов с полной и выраженной зависимостью в повседневной жизни по индексу Бартела в основной группе составило 2 (33%), в контрольной 6 (50%). По сравнению с контрольной группой (4 (67%) против 6 (50%), в группе больных, получавших терапию клетками пуповинной крови, выявили увеличение количества больных с

умеренно-легкой зависимостью и полной независимостью. У 4 (67%) больных основной и 7 в контрольной (59%) группе был отмечен хороший и удовлетворительный исходы по шкале Рэнкина. Неудовлетворительный исход у 2 (33%) больных в основной и 5 (41%) пациентов в контрольной группе.

Заключение. Применение клеток пуповинной крови может явиться безопасным и эффективным методом лечения ишемического инсульта.

ОСОБЕННОСТИ СВОЙСТВ МАТРИЦ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРИЗОВАННЫХ БИОПОЛИМЕРОВ

Егорихина М.Н.^{1*}, Алейник Д.Я.¹, Рубцова Ю.П.¹, Чарыкова И.Н.¹, Соснина Л.Н.¹, Мухина П.А.², Бронникова И.И.²

1. ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, Нижний Новгород, Россия

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

*egorihina.marfa@yandex.ru

Стремительное развитие регенеративной медицины во многом обусловлено многочисленными разработками в области тканевой инженерии, которая базируется на скаффолд-технологиях. Скаффолды играют ключевую роль в тканевой инженерии, обеспечивая успешные клеточные события и интеграцию тканеинженерной конструкции в организм пациента. В связи со своими уникальными свойствами и пластичностью в отношении различных модификаций широкое распространение получили скаффолды на основе биополимерных гидрогелей. Это определяет актуальность разработки новых поликомпозиционных скаффолдов на основе природных полимеров и исследование влияния различных факторов на структурные, механические и биологические свойства формируемых матриц.

Материалы и методы. Для формирования скаффолда (Пат. №2653434 от 11.04.2017) использовали криопреципитат плазмы крови полученной от здоровых доноров и коллаген I типа. Клеточный материал – ММСК жировой ткани человека. Исследование структуры скаффолдов – сканирующая и трансмиссионная электронная микроскопия. Механические характеристики скаффолдов определяли на УИМ AG-Xplus-0.5 (Japan). Для контроля над ростом клеток использовали методы световой, фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии. Секреторную активность клеток оценивали с использованием ИФА.

Результаты. Охарактеризована внутренняя архитектура и механические характеристики гидрогелевых скаффолдов, полученных при сополимеризации компонентов плазмы крови и коллагена двух видов. Установлено, что вид коллагена при сополимеризации с фибрином оказывает значительное влияние на структурные и механические свойства скаффолдов. Культивирование ММСК в этих гидрогелях показало, что они могут обеспечивать условия, способствующие поддержанию жизнеспособности, типичной морфологии, высокой пролиферативной и секреторной активности. Полученные результаты будут полезны при разработке конструкций с тканеподобными свойствами.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НЕПОКРЫТЫХ НАНОЧСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ *IN VIVO* МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Енукашвили Н.И.^{1*}, Левчук К.², Багаева В.В.^{3,2}, Боголюбов Д.С.¹, Боголюбова И.О.¹, Шумеев А.Н.³, Золина Т.Л.³, Котова А.В.^{3,2,1}, Масленникова И.И.², Артамонов А.⁵, Марченко Н.В.⁴, Миндукшев И.В.⁶, Коткас И.Е.⁵

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 2. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
 3. Покровский Банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, Россия
 4. НИИ детских инфекций, Санкт-Петербург, Россия
 5. Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия
 6. ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
- *natellae@gmail.com

Для проведения фундаментальных исследований, а также доклинических и клинических исследований биомедицинских клеточных продуктов требуется надежный метод исследования биораспределения *in vivo*. Для крупных организмов таких, как человек, магнитно-резонансная томография (МРТ) представляется оптимальным методом визуализации. Однако для отслеживания клеток в организме методами МРТ необходимо введение в живые клетки контрастирующих агентов, например, суперпарамагнитных частиц (SPION) оксида железа Fe₃O₄.

Цель работы. Разработка протокола мечения клеток SPION для визуализации *in vivo* с помощью применяемых в клинике 1Т и 1,5Т МРТ-сканеров.

Материалы и методы. Размеры частиц оценивали с помощью методов динамического рассеивания света (DelsaMax Pro, Beckman Coulter) и лазерной дифракции (LASKA, Россия). Мезенхимные стромальные клетки (МСК) получали из периваскулярного пространства пупочной вены у новорожденных при наличии информированного согласия. Определяли иммунофенотип, дифференцировочный потенциал, способность к пролиферации, миграции и возможность криоконсервации меченых клеток. Ультраструктуру клеток исследовали методами электронной микроскопии (ЕМ).

Результаты. Начальный размер частиц после обработки ультразвуком составлял 100 нм. Через 2 мин. после остановки перемешивания SPION формировали агрегаты со средним диаметром 1 мкм, и далее размер агрегатов оставался без изменений. Оптимальная интенсивность мечения, при которой клетки легко визуализировались методами МРТ и при этом не изменяли своих свойств, наблюдалась при концентрации SPION 50-300 мкг/мл. Очищенные

методом магнитной сепарации клетки сохраняли жизнеспособность ($95\pm 2\%$) и иммунофенотип МСК. Способность к дифференцировке и пролиферации сохранялась на уровне контрольных немеченых клеток от того же донора. Введение SPION не влияло на способность клеток к миграции в условиях скрэтч-теста. Клетки сохраняли SPION при криоконсервации, размораживании и последующем культивировании. При исследовании электронно-микроскопическими методами показано сохранение ретикулярного ядрышка с выраженными фибриллярными центрами, плотным фибриллярным и гранулярным компонентами, что предполагает высокую активность ядрышка. В цитоплазме выявляли хорошо развитый ШЭР и свободные рибосомы, что подтверждает высокую активность белкового синтеза в клетках. В цитоплазме МСК также выявлены мультивезикулярные тела, что подтверждает особенность МСК – существование в состоянии неполной аутофагии, для которой характерно накопление аутофагосом в цитоплазме. Для оценки влияния SPION на процессы аутофагии МСК необходимы дальнейшие исследования. Меченые клетки визуализировали в тканях животных и человека с помощью 1.5 и 1Т томографов. SPION использовали как T1 и T2 контрастирующие агенты.

Заключение. Разработанный протокол может быть использован для введения в клетки SPION. Необходимы дальнейшие исследования для оценки влияния SPION на физиологию МСК.

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУЛЬПЫ ЗУБА И ТКАНЕЙ ПЕРИОДОНТА В СТОМАТОЛОГИИ

Енукашвили Н.И.^{3*}, Домбровская Ю.А.², Айзенштадт А.А.^{1,2}, Багаева В.В.^{1,2}, Масленникова И.И.^{1,2}, Елсукова Л.В.¹, Котова А.В.^{1,2,3}, Золина Т.Л.¹, Иволгин Д.А.^{1,2}

1. ООО «Покровский Банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

2. ФГБОУ «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

3. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*nie@newmail.ru

Актуальность. Стволовые клетки (СК) тканей зуба и ротовой полости подразделяют на СК пульпы молочных зубов, постоянных зубов, а также периодонтальные, апикальные, фолликулярные СК, СК мягких тканей десны. Все эти клетки, в силу своего происхождения в эмбриогенезе, являются оптимальным клеточным материалом для восстановления костных и хрящевых тканей черепно-лицевого отдела скелета, в том числе тканей зуба и периодонта. СК тканей зуба и ротовой полости обладают свойствами мезенхимных стволовых клеток. В Покровском Банке стволовых клеток разработана собственная технология выделения клеток из пульпы зуба молочных и постоянных зубов, а также налажено выделение СК из тканей периодонта. Создается регистровый (донорский) банк СК тканей зуба и периодонта для последующего использования в научных и прикладных целях. Процесс выделения и криоконсервации организован в соответствии со стандартами GTP (Good Tissue Practice). Предполагается, что разные типы СК ротовой полости обладают разными биологическими свойствами и, следовательно, могут различаться их показания к клиническому применению. Поэтому необходимо тщательное сравнительное исследование таких свойств на доклиническом этапе.

Целью исследования являлась сравнительная морфофункциональная характеристика стволовых клеток пульпы постоянных и молочных зубов, а также периодонта.

Материалы и методы. Использовали молочные зубы, выпавшие или удаленные во время физиологической смены зубов (4 зуба), а также интактные дистопированные или ретенированные третьи моляры (8 зубов). Удаленные зубы вместе с сохраненными тканями периодонта помещали в транспортировочный раствор и доставляли в лабораторию. В стерильных условиях отделяли связки и проводили их ферментативную обработку. Для извлечения СК из пульпарной камеры использовали два метода: заполнения корней и пульпы ферментирующим раствором через вскрытые с апикальной стороны корневые каналы или

раскалыванием коронки зуба в продольном направлении и последующей ферментацией пульпы. Полученные СК пульпы (СКП) и СК периодонта (СКПд) культивировали отдельно. Фиксировали морфологические характеристики, скорость пролиферации, набор поверхностных маркеров (по которым клетки относят к стволовым) способность к дифференцировке в различных направлениях.

Результаты. СКП постоянных и молочных зубов и СКПд обладали фибробластоподобной морфологией, типичной для СК данного типа. Однако скорость пролиферации СКПд в два раза превышала скорость роста СКП постоянных зубов и в 1.4 раза – СКП молочных зубов во всех изученных парах сравнения (т.е. полученных от одного пациента). Обе популяции клеток обладали характерным для постнатальных СК набором поверхностных маркеров (CD90+/CD105+/CD44+/CD73+/CD45-/CD34-/CD14-). Однако, и культуры клеток СКП постоянных зубов и СКПд содержали около 20% CD117-позитивных стволовых клеток, а культуры СКП молочных зубов часто содержали примесь клеток моноцитарной линии. В популяциях СК из других источников (жировой ткани, костного мозга, пуповины и амниона) такие клетки очень редки. В зубе CD117+ клетки располагаются в коронковой части пульпы, их рассматривают как недифференцированный периневральный компонент пульпы, необходимый для обеспечения роста нерва и сосудов зуба. Предполагается, что это наименее дифференцированная часть СК зуба и периодонта.

Как СКП, так и СКПд обладали способностью к дифференцировке в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях. Для постоянных зубов скорость дифференцировки в остеогенном направлении для СКП в 2,45 раза превышала скорость дифференцировки СКПд. При дифференцировке СКП первые кальцификаты появлялись в культуре клеток уже на 4 день, в то время как в культуре СКПд – только на 11 день. Различались также и форма кристаллов и характер их скоплений, что предполагает различный кальциево-фосфатный состав кристаллов, однако данный вопрос нуждается в дальнейшем исследовании. Через 25 дней от начала дифференцировки различия в степени дифференцированности сглаживались. То есть СКПд достигали той же степени дифференцированности, что и СКП, но за более длительный период.

Выводы. СКП и СКПд обладают различными морфо-функциональными характеристиками. СКП обладают гораздо более выраженным остеогенным потенциалом по сравнению с СК СКПд. Последние, в свою очередь, более интенсивно пролиферируют. В дальнейшем, планируется в доклинических исследованиях оценить эффективность СКП и СКПд для ускорения восстановительных процессов в костной ткани и тканях периодонта, соответственно.

КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация
- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):

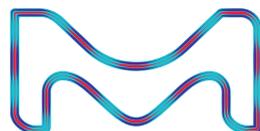
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфоцитарных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com, ruorder@sial.com

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture



SIGMA-ALDRICH is now MERCK

СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ В ЛЕЧЕНИИ ВАСКУЛОГЕННОЙ ЭРЕКТИЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Епифанова М.В.^{1*}, Чалый М.Е.², Гвасалия Б.Р.³, Еремин И.И.⁴, Пулин А.А.⁴,
Артемченко С.А.⁵

1. Кафедра клинической андрологии РУДН, Москва, Россия
 2. МНОЦ МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 3. 3-й Центральный военный госпиталь клинический госпиталь им. А.А. Вишневского, Красногорск, Россия
 4. ФГБНУ НИИОПП, Москва, Россия
 5. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия
- *epifanova_maya@mail.ru

Введение. Распространенность эректильной дисфункции (ЭД) является актуальной и растущей проблемой. Доклинические исследования по применению стромально-васкулярной фракции (СВФ) показали многообещающие результаты. Здесь мы сообщаем результаты I/II фазы клинического исследования по лечению ЭД с помощью СВФ (NCT02472431).

Цель работы. Оценка эффективности и безопасности интракавернозного введения СВФ в лечении ЭД. Получено одобрение независимого междисциплинарного комитета по этике.

Материалы и методы. 12 мужчинам (средний возраст 47 лет) с васкулогенной эректильной дисфункцией была выполнена липосакция из области передней брюшной стенки и фланков в объеме 117 ± 49 см³. СВФ, после ферментативной обработки коллагеназой, получали на аппарате Celution 800/CRS System. Среднее содержание клеток - $122 \pm 51 \times 10^6$ в 1 мл клеточного продукта. Готовую СВФ однократно вводили в каждое кавернозное тело в объеме 2,0 мл, с последующим наложением турникета на основание полового члена на 15 минут. Методы оценки эректильной функции (0, 12 и 24 недели): фармакодупплерография (ФДГ) сосудов полового члена с простагландином E1; системная оценка эндотелия сосудов (Ангиоскан-01); Международный индекс эректильной функции (МИЭФ-5); профиль половых отношений (SEP); шкала твердости эрекции (EHS).

Результаты и обсуждения. Интракавернозные инъекции СВФ хорошо переносилось всеми пациентами. Каких-либо нежелательных явлений, осложнений отмечено не было. Через 24 недели при ФДГ, пиковая систолическая скорость увеличилась и достигла по левой кавернозной артерии 36 см/с (32-46) и 35 см/с (30-49,5) по правой кавернозной артерии; индекс резистентности по

левой кавернозной артерии составил 0,91 (0,83-0,97) и 0,91 (0,85 - 0,97) по правой кавернозной артерии. Валидированные опросники: МИЭФ-5 - 17 (13-20); EHS - 3 (2-4); SEP - 3 (2-4). По данным Ангиоскан-01 - значительное улучшение эндотелиальной функции спустя 6 месяцев.

Заключение. Клиническое исследование завершено, получен патент RU2622757. Преимуществом данного метода является высокая эффективность, вызванная действием компонентов СВФ. Отсутствие осложнений и побочных эффектов позволяет безопасно применять данный метод в лечении ЭД. В настоящий момент идет набор пациентов для проведения мультицентрового клинического исследования II b фазы.

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ СЕПАРАЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА

Иволгин Д.А.^{1,2*}, Адылов Ш.Ф.¹, Шералиев А.Р.³, Шумеев А.Н.¹

1. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург
 2. НИЛ клеточных технологий ГБОУ ВПО «Северо-Западный Государственный медицинский Университет им. И.И. Мечникова», Санкт-Петербург
 3. ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Минздрава России, Санкт-Петербург
- *ida59m@mail.ru

Введение. В 1991 году профессором П. Рубинштейном был предложен метод получения фракции моноклеарных клеток пуповинной крови (ПК). Данный метод, получивший название «двойное центрифугирование», широко используется в повседневной деятельности банков стволовых клеток. С целью повышения эффективности выделения моноклеарной фракции (МНФ) были разработаны автоматизированные методы - полуавтоматический и автоматический. В исследовательских протоколах по возможному клиническому применению МНФ также изучается МФ, полученная из костного мозга.

Цель исследования: разработка способа выделения МНФ из костного мозга с использованием полуавтоматической системы сепарации и оценка его эффективности.

Материалы и методы. Исследование проводилось в сентябре-декабре 2016 года. В исследование были включены 8 пациентов с различной патологией печени тяжелой степени в возрасте от 44 до 60 лет из листа ожидания ТП центра. Костный мозг получали путем пункции задневерхних остей подвздошной кости с последующей аспирацией. МНФ костного мозга выделялась из полученного материала при помощи сепаратора MacoPress Smart (MacoPharma, Франция) с последующим фенотипированием и оценкой жизнеспособности с помощью проточного цитометра FC500 (Beckman Coulter, США). Кроме того, количество ядросодержащих клеток в исходном образце и полученной МНФ подсчитывалось при помощи гематологического анализатора Coulter AcT diff 2 (Beckman Coulter, США). Эффективность выделения МНФ определялась как процент ОЯК в МФ от исходного количества.

Результаты. Средний объем аспириата КМ составил $270 \pm 35,5$ мл, средний объем полученной МНФ составил $47,3 \pm 4,3$ мл. Среднее количество ядросодержащих клеток КМ (исходно) и МНФ составило $3830,15 \times 10^6$ и 3523×10^6 соответственно. Эффективность выделения МНФ составила $90,4 \pm 18,8$ %. Жизнеспособность по данным проточной цитометрии составила 93,2%.

Заключение. Полученные данные позволяют считать полуавтоматический способ выделения МНФ из КМ эффективной и воспроизводимой процедурой в рамках деятельности банка стволовых клеток с перспективой возможного клинического применения данного биологического продукта в регенеративной медицине.

БИОМЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ УПРАВЛЕНИЯ РЕПАРАТИВНЫМ ОСТЕОГЕНЕЗОМ

Ильина В.К., Омельяненко Н.П., Кожевников О.В., Иванов А.В., Прохорова Е.В.

ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» МЗ РФ, Москва, Россия
ilina6774128@yandex.ru

Восстановление целостности поврежденных костей остается одной из сложных и до конца не решенных проблем в травматологии и ортопедии. Часто в процессе лечения детей с диспластическими заболеваниями соединительной ткани наблюдается снижение темпов остеорепарации. В связи с этим становится очевидной необходимость воздействия на репаративные процессы в зоне проводимой коррекции.

Интерес к стромальным (соединительнотканным) клеткам костного мозга обусловлен теоретическим и практическим значением, т.е. возможностью применения их в терапевтических целях при различных патологических состояниях.

Цель данной работы - привлечение клеточных технологий для стимуляции репаративного остеогенеза.

В работе использовались клеточные культуры (от 2-го до 5-го пассажей) аутологичных стромальных клеток костного мозга и культуры остеогенных клеток-предшественников надкостницы. Перед трансплантацией клеток культуры проходили многочисленные контроли. Клеточная суспензия (5-10 млн клеток) в физиологическом растворе инъецировалась в область distraction или ложного сустава с кратностью 3-5 инъекций, раз в 5 дней. Комплексное лечение с использованием клеточной терапии проведено 20 пациентам в возрасте от 1 года до 16 лет с неравенством длины конечностей и врожденным ложным суставом костей голени.

Результаты проведенного исследования показали не только сокращение сроков созревания регенерата, но и значительное улучшение качества его после динамической стимуляции в периоде коррекции длины кости. У пациентки с врожденным ложным суставом костей голени удалось добиться начала консолидации после резекции ложного сустава уже через 2,5 месяца после операции. В области distraction в верхней трети большеберцовой кости у этой пациентки сформировался регенерат высокой рентгенологической плотности.

Таким образом, положительный результат использования клеточных технологий для стимуляции остеорепарации открывает перспективы для более эффективного лечения патологий опорно-двигательного аппарата.

ПЕРСПЕКТИВЫ ЭНДОСКОПИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНЫХ СВИЩЕЙ ВВЕДЕНИЕМ *IN SITU* КУЛЬТИВИРОВАННЫХ АЛЛОФИБРОБЛАСТОВ

Ионов П.М.^{1,2*}, Юркевич Ю.В.³, Дейнега И.В.¹, Беседина Н.К.¹, Багаева В.В.^{2,3}

1. ГБУЗ Городская Покровская больница, Санкт-Петербург, Россия

2. ФГБОУ ВО Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

*ionovpavelm@mail.ru

Значимость проблемы лечения послеоперационных бронхиальных свищей в настоящее время не вызывает сомнений. Эндоскопическая тактика закрытия фистул, несмотря на достоинства (доступность, переносимость, возможность многократного проведения и др.), остается недостаточно разработанной и имеет ограниченное применение. Один из путей совершенствования данного направления может заключаться в эндобронхиальной окклюзии свища с использованием клеточных технологий.

В исследование включено 17 пациентов с бронхоплевральными свищами после пневмонэктомий (10 право- и 7 левосторонних), выполненных по поводу рака легкого (82,4%), инфекционной деструкции (11,8%) и туберкулеза (5,9%). Мужчин было 11, женщин - 6. Средний возраст больных составил 63 года. Сроки развития несостоятельности культи главного бронха и эмпиемы плевры после оперативного вмешательства варьировали от 3 суток до 7 лет. Длина культи бронха была до 10 мм. Диаметр дефекта составлял от 2 до 10 мм. Эндобронхиальное лечение проводилось в отдаленном периоде (после уменьшения интоксикации, санации гнойной полости) и заключалось в подслизистой инъекции суспензии культивированных алогенных фибробластов человека в область фистулы. Введение препарата осуществлялось с помощью бронхоскопической канюли в зону свища из 2-5 точек общим объемом 1,5 мл. Концентрация аллофибробластов составляла $3 \cdot 10^6$ клеток/мл. Культивирование фибробластов осуществляли с использованием общепринятых методических приемов. Проведен контроль вирусной и бактериальной контаминации, а также цитогенетический анализ хромосом для подтверждения нормального кариотипа культур клеток. Состояние культи бронха и остаточной плевральной полости контролировалось выполнением бронхоскопии, рентгенографии легких, КТ исследования.

После однократного введения суспензии фибробластов свищ закрылся в 7 наблюдениях из 17 (41,2%) в течение 4 недель. У 10 больных свищевой ход сохранялся, эндоскопическая инъекция фибробластов проведена повторно. При контрольном эндоскопическом и рентгенологическом обследовании через 4

недели после повторной инъекции свищ закрылся еще у пяти пациентов (29,4%). В последующем (срок наблюдения от 3 до 12 месяцев) рецидивов свищей не отмечено. В пяти случаях (29,4%) бронхиальный свищ уменьшился в диаметре, но не закрылся. Это были больные после правосторонней пневмонэктомии по поводу рака легкого. У 4 пациентов имела место крайняя степень белково-энергетической недостаточности. У одного – дисметаболический синдром на фоне сахарного диабета. Последующее комплексное лечение позволило стабилизировать течение воспалительного процесса в эмпиемной полости.

Бронхоэндоскопическое субмукозное введение суспензии аллофибробластов в проекцию фистулы после пневмонэктомии является достаточно перспективным способом закрытия бронхиальных свищей. Указанная методика позволила получить стабильный окклюзионный эффект в зоне свищевого хода у 70,6% пациентов. Полученные клинические результаты открывают новые пути применения и дальнейшего совершенствования клеточных технологий в торакальной хирургии.

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕЗОРБИРУЕМОЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИВИНИЛОВОГО СПИРТА С ДОБАВЛЕНИЕМ ФУЛЛЕРЕНОВ C₆₀.

А.В.Кабаньков, А.С.Иванов, С.С.Мнацаканов, В.П.Румакин, Л.Н.Орехова

*Военно-Медицинская Академия им. С.М.Кирова, РНИИТО им. Р.П.Вредена,
Институт Кино и Телевидения.
Санкт-Петербург*

Актуальность исследования вызвана тем, что после проведения хирургических операций развиваются осложнения, в том числе и в виде дефицита костной ткани. Представлен междисциплинарный подход с остеогенезу.

Цель исследования – выяснить возможность применения фуллеренов C₆₀ в мембранах на основе поливинилового (ПВС) для повышения результативности остеопластических операций с применением метода направленной регенерации костной ткани.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования были проведены на 132 беспородных белых крысах 189-200 гр. Проводилось токсикологическое и морфологическое исследование свойств биоматериалов, предназначенных для восстановления утраченных структурных элементов костной ткани. Животные были разделены на 2 группы. В первой группе изучали реакцию тканей на трансплантационные материалы ПВСФ₆₀ в виде перфорированных пленок 10x5x1 мм, во второй группе изучалось влияние резорбируемых мембран на основе ПВС на остеогенез, провели сравнение с остеопластическим материалом «Остеопласт». В искусственно созданный пропил кортикального слоя бедренной кости животных с локальным нарушением целостности надкостницы под обезболиванием вводили вышеперечисленные препараты. Выведение животных из опыта осуществляли на 14, 28 и 42 сутки. Декальцинированные фрагменты нарезали, окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван Гизону.

Результаты исследования. В первой группе после операции наблюдалась гиперемия и припухлость мягких тканей в области хирургического вмешательства разной степени. Швы с ран были сняты на 8 сутки. Гистологическая картина была одинаковой. Пленки на основе ПВСФ₆₀ обнаруживались в лимфоцитах и резорбировали к 42 суткам, в то время как контрольные пленки на основе ПВС осумковывались.

Следовательно, можно предположить, что пластинки на основе ПВСФ₆₀ являются биорезорбируемыми и биоактивными.

Во второй группе зрелость вновь образованного регенерата кортикального слоя при применении резорбируемых мембран на основе ПВСФ₆₀ в сравнении с «Остеопластом» была лучше по архитектонике, кортикальный слой был более зрелым.

Выводы: проведенные экспериментальные исследования показали, что мембраны на основе композиции ПВС с добавлением фуллеренов являются не только биосовместимыми, но и биологически активными материалами, хорошо совместимыми с клеточными культурами благодаря отсутствию токсичности и гипоаллергенности.

Мембраны на основе ПВСФ₆₀ существенно влияют на процесс остеогенеза. Во первых, ускоряют процесс созревания костной ткани, который происходит быстрее, чем при введении остеопластического материала «Остеопласт». Во вторых, при использовании мембран на основе ПВСФ₆₀ качественные характеристики вновь образованного регенерата костной ткани лучше.

Применение мембран на основе композиции ПВС с добавлением фуллеренов С₆₀ оправдано как их свойствами, так и удобством работы с ними.

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К СОХРАНЕНИЮ ФЕРТИЛЬНОСТИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ – ОПЫТ ДОЗРЕВАНИЯ ООЦИТОВ EX VIVO

Калугина А.С., Корчагина Н.М., Лапина Е.Н., Каменецкая Ю.К., Мухина Ю.И., Шлыкова С.А.

ООО «АВА-Петер», СПб, Россия

В докладе будут представлены современные подходы к сохранению фертильности онкологических пациентов и освещен первый опыт применения стратегии дозревания - ex vivo для той категории больных, у которых существует высокий риск контаминации злокачественными клетками при трансплантации и которым трансплантация криоконсервированной ткани яичника не показана. В настоящее время для этих пациенток дозревание ex vivo является единственной возможностью сохранения фертильности.

Перед криоконсервацией ткани из овариального кортекса собирали незрелые (на стадии GV) ооциты из крупных преантральных фолликулов. Эти ооциты дозревали с использованием сред и стандартного протокола для IVM (Origio). Дозревшие ооциты витрифицировали с использованием сред, носителей и протокола Kitazato.

Исследование проводилось в клинике Ава-Петер с 2016 по 2018 годы и представляло собой ретроспективный анализ 17 случаев дозревания ооцитов, полученных у онкологических пациенток. Средний возраст пациенток составил 29 лет (от 8 до 42). Пациентки обратились в клинику непосредственно перед проведением лучевой или высокодозной химиотерапии в связи с основным диагнозом, планируя предварительное осуществление лапароскопической резекции фрагмента яичника или овариоэктомии с последующим программным замораживанием кортекса в программе сохранения фертильности онкологических пациентов. У двух пациенток в анамнезе были курсы лучевой и химиотерапии. Три пациентки обратились в клинику с диагнозом рак яичника, что категорически исключает обратную аутотрансплантацию ткани кортекса.

Всего при препарировании ткани овариального кортекса было получено 110 незрелых ооцитов. Среднее количество ооцитов на пациентку составило 7,3 ооцита (1-28), среднее количество ооцитов достигающих при дозревании стадии MII составило 2,9 ооцита (1-8). В среднем 30% ооцитов достигали стадии MII. Большое количество ооцитов в ходе дозревания дегенерировало (36%), что может быть связано с несовершенной системой транспортировки образцов в эмбриологическую лабораторию и, вероятно, может быть улучшено.

Стратегия сбора незрелых ооцитов во время препарирования кортекса с последующим дозреванием и витрификацией является перспективной. В литературе имеется сообщение о наступлении клинической беременности после использования дозревших ооцитов, полученных из яичников ex vivo.

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ КРИОПРОТЕКТОРОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Климович П.С.^{1*}, Семина Е.В.^{1,2**}, Ефименко А.Ю.³, Сысоева В.Ю.¹

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

2. НМИЦК Минздрава России, Москва, Россия

3. ИРМ МНОЦ МГУ имени М.В.Ломоносова, Москва, Россия

*lex2050@mail.ru

**e-semina@yandex.ru

Стволовые клетки мезенхимального происхождения человека (МСК) представляют собой перспективный материал для регенеративной медицины, однако клинические испытания, проводимые с применением МСК, не всегда дают положительный эффект. Причинами неэффективности терапии могут быть несовершенства протоколов выделения и криоконсервации клеток. Разные клетки имеют разную переносимость одного и того же криопротектора и после размораживания и отмывки от криопротекторов обладают разной выживаемостью и пролиферацией. Эти факты делают необходимым подбор оптимального криопротектора для каждого типа клеток с целью сохранения свойств клеток для их использования в терапевтических целях.

Для анализа криопротективных свойств различных веществ на пролиферацию и жизнеспособность использовали линию иммортализованных МСК человека (TERT). Клетки замораживали в коммерческих криопротекторах CryoStore®, содержащих различную концентрацию диметилсульфоксида (DMCO 2%, 5% или 10%), в сыворотке человека, содержащей DMCO 2%, 5% или 10%, а также в бессывороточной криосреде Synth-a-Freeze® CTS™. Через 30 дней клетки рекультивировали. В качестве контроля использовали клетки не прошедшие этап криозаморозки.

При оценке выживаемости TERT после разморозки обнаружено, что в случае криоконсервации в сыворотке с 2% DMCO жизнеспособность клеток существенно снижена по сравнению с другими криопротекторами. Однако уже через 24-72 ч повышается выживаемость всех клеток после криоконсервации до уровня контроля, в том числе и клеток, криоконсервированных в сыворотке с 2% DMCO.

Пролиферативная активность клеток, криоконсервированных в криопротекторах CryoStore® и Synth-a-Freeze® CTS™ и сыворотке с 5% DMCO через 24 и 72 ч статистически не отличается от контроля, а пролиферация клеток

после криоконсервации в сыворотке с 2% и 10% ДМСО достоверно ниже контрольных клеток.

Полученные результаты позволяют предположить, что в терапевтических целях следует использовать клетки, рекультивированные минимум 24 ч для повышения их выживаемости. Использование сыворотки с 2% и 10% ДМСО снижает пролиферативную способность клеток, вероятно 10% ДМСО обладает токсическим эффектом, а 2% ДМСО недостаточен для криопротекторных свойств.

Работа выполнена с использованием биоматериала человека, собранного и сохраняемого в рамках научной программы «Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем» (соглашение РНФ №14-50-00029), и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

ВЛИЯНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ КРИОПРОТЕКТОРА ДМСО В СРЕДЕ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА ИХ ВЫЖИВАЕМОСТЬ, ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ

Климович П.С.¹, Сысоева В.Ю.¹, Рубина К.А.¹ Семина Е.В.^{1,2*}

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

2. НМИЦК Минздрава России, Москва, Россия

*e-semina@yandex.ru

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека секретируют широкий спектр факторов роста, хемокинов и микроРНК, что обуславливает их высокий терапевтический потенциал для эндогенной стимуляции ангио-, нейро- и дерматогенеза. Количество МСК при выделении из ткани ограничено, и для получения требуемой терапевтической дозы требуется их амплификация. По данным литературы в многочисленных терапевтических исследованиях доза внутривенного введения МСК составляет 10^6 клеток на 1 кг веса. Такое количество клеток не всегда удается получить из ткани доноров, поэтому для решения этой проблемы применяют алогенные МСК, полученные из биобанка клеток. Более того, некоторые терапевтические подходы требуют многократного введения МСК, поэтому для сохранения популяции стволовых клеток используют их криоконсервацию. Наиболее часто применяемый криопротектор - диметилсульфоксид (ДМСО), используемый, как правило, в концентрации 10%, однако накоплены данные о его высокой токсичности при такой концентрации. В связи с этим протоколы криоконсервации МСК должны быть оптимизированы для увеличения выживаемости клеток и сохранения их пролиферативных и секреторных свойств.

В данном исследовании были выделены и культивированы МСК из жировой ткани 5 доноров. Часть клеток культивировали и использовали в качестве контроля, а другую криоконсервировали в криосредах с содержанием ДМСО 2, 5 и 10% соответственно, а затем рекультивировали.

При анализе пролиферативной активности и выживаемости МСК через 24 и 72 ч характеристики контрольных клеток и клеток, криоконсервированных в ДМСО 5% и 10% статистически не отличались, в то время как клетки, криоконсервированные в ДМСО 2% в 3 из 5 случаев не удалось рекультивировать. В ходе оценки функциональной активности МСК, а именно оценки уровня секреции факторов роста VEGF, HGF, Ang-1, BDNF и GDNF, контрольные клетки и клетки, после криоконсервации в ДМСО 5% обладали схожей секреторной

активностью, в то время как у клеток после криоконсервации в ДМСО 10% секреторная активность была значительно ниже.

Полученные результаты показали, что для криоконсервации МСК оптимально использование криосреды с 5% содержанием ДМСО, что позволяет сохранить жизнеспособность и пролиферативную активность клеток и получить после разморозки популяцию МСК, функциональные характеристики которой соответствуют незамороженной популяции.

Работа выполнена с использованием биоматериала человека, собранного и сохраняемого в рамках научной программы Научные основы создания национального банка-депозитария живых систем (соглашение РНФ №14-50-00029), и оборудования, приобретенного за счет средств Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

STEM CELLS: BEST SOURCES AND ANTIAGING APPLICATIONS

Kovina M.V.¹, Karnaukhov A.V.², Krasheninnikov M.E.¹, Kovin A. L.¹, Sergievich L.A.², Karnaukhova E.V.², Bogdanenko E.V.³, Balyasin M.V.¹, Khodarovich Y.M.⁴, Danilevsky M.I.¹, Dyuzheva T.G.⁵, Lyundup A.V.¹

1. *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine; Sechenov First Moscow State Medical University*
2. *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*
3. *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*
4. *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
5. *City clinical hospital №7 of Yudin, Moscow, Russia*
gershi2001@yahoo.com

The increase in MLS, maximum lifespan, is the most significant indicator of affecting the basic mechanisms of aging, in particular, the age-related loss of stem cells. The transplantation of young bone marrow (BM) to laboratory mice of advanced age, results in 6-30% of average life span extension in varies studies, while we achieved $31\pm 3\%$ extension of maximal life span due to nonablative syngeneic large infusion technology. The survival time from the beginning of the experiment increased 3 ± 0.3 -fold. The chimerism of the bone marrow 6 months after the transplantation was 28%. The result is encouraging for clinical adaptation for aged humans (70-80-years old). The richest source of highly proliferative mesenchymal stem cells is menstrual blood. We have developed the high yield isolation approach resulting up to four million nucleated cells per milliliter of initial blood, of which about 0.2-0.3% are colony-forming cells expressing standard mesenchymal markers CD90, CD105, and CD73, but not expressing CD45, CD34, CD117, CD133, or HLA-G. The cells have high proliferative potential (doubling in 26 h) and the ability to differentiate into adipocytes and osteocytes. Early endometrial MSCs (eMSCs) express epithelial marker cytokeratin 7 (CK7). We show for the first time that a satisfactory and stable yield of eMSCs is observed throughout the whole menstrual period (five consecutive days) of a healthy woman. eMSC mass cryobanking would solve the issue of donation, which is very acute now and might become even more complicated in the future, especially in view of geriatric application of stem cells.

КОРРЕКЦИЯ ИММУННЫХ НАРУШЕНИЙ У ПАЦИЕНТОВ С ЭПИЛЕПСИЕЙ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Космачева С.М.¹, Гончарова Н.В.¹, Мороз Л.А.¹, Хлебоказов Ф.П.²

1. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Республика Беларусь

2. РНПЦ психического здоровья, Минск, Республика Беларусь

*4kosmacheva@mail.ru

К настоящему времени имеется достаточно наблюдений, свидетельствующих о нарушении состояния иммунной системы у пациентов с симптоматической эпилепсией. Известно, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК) обладают способностью оказывать иммуномодулирующее действие.

Цель настоящего исследования – изучить изменения субпопуляционного состава иммунокомпетентных клеток периферической крови у пациентов с симптоматической эпилепсией, получавших клеточную терапию с использованием аутологичных МСК на фоне приема противоэпилептических лекарственных средств.

Методы. В исследование включены 12 пациентов с симптоматической эпилепсией. Возраст пациентов - от 20 до 54 лет (5 мужчин, 7 женщин). Курс клеточной терапии включал однократное внутривенное введение интактных клеток (в среднем – 1 млн/кг веса) и через 6-7 дней - эндолюмбальное введение нейроиндуцированных МСК (5-10 млн). Состояние Т-клеточного иммунитета оценивали до клеточной терапии и через неделю после эндолюмбального введения нейроиндуцированных МСК с использованием моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACSCantoll (Becton Dickinson, США), программное обеспечение BD FACSDiva v7.0.

Результаты. У пациентов с симптоматической эпилепсией отмечен ряд изменений в показателях клеточного иммунитета до начала применения МСК. Проведение одного курса клеточной терапии приводит к достоверному повышению содержания Т-лимфоцитов за счет CD3⁺CD4⁺ Т-хелперов ($p=0,023$) и снижению количества CD3⁺CD8⁺ цитотоксических Т-клеток ($p=0,036$), в результате чего соотношение основных популяций Т-клеток приближается к показателям нормы. О нормализации субпопуляционного состава Т-лимфоцитов свидетельствует снижение в 3 раза количества активированных CD3⁺HLA-DR⁺ Т-клеток ($p=0,003$) и в 1,75 раза CD3⁺CD8⁺CD57⁺ - клеток с высокой цитолитической активностью ($p=0,027$) при повышении содержания минорной субпопуляции цитолитических CD3⁺CD4⁺CD57⁺ Т-хелперов ($p=0,011$). Отмечается также снижение содержания CD3⁺CD57⁺ и CD3⁺CD56⁺CD57⁺ популяций ЕК клеток.

Вывод. Таким образом, аутологичные МСК оказывают иммуномодулирующий эффект у пациентов с симптоматической эпилепсией.

NOTCH-ЗАВИСИМЫЕ МЕХАНИЗМЫ МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК

Костина А.С.^{1*}, Малашичева А.Б.^{1,2*}, Семенова В.С.^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр им. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*aleksandrakostina1991@gmail.com

Сигнальный путь Notch является ведущим в развитии и поддержании тканей, содержащих сосуды. Дисфункция эндотелиальных клеток приводит к возникновению многих патологий. Полагают, что эндотелиальные клетки определяют дифференцировку подлежащих клеток мезенхимного происхождения, обеспечивая таким образом целостность и функциональность соответствующей ткани. Механизмы взаимодействия клеток разных типов и вклад этих взаимодействий в определение клеточной судьбы остаются слабо изученными. Исследование Notch-зависимых механизмов межклеточных взаимодействий на модели сокультивирования первичных эндотелиальных и мезенхимных клеток человека обладает, таким образом, актуальностью как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения понимания механизмов возникновения сосудистых патологий.

Целью исследования являлось изучение роли сигнального пути Notch в опосредовании остеогенной дифференцировки при межклеточных взаимодействиях. В качестве клеточных моделей были использованы эндотелиальные клетки пуповинной вены человека, гладкомышечные клетки аорты человека и мезенхимные стволовые клетки жировой ткани человека. Оценивали активацию рецепторов и лигандов Notch пути при сокультивировании эндотелиальных клеток и клеток мезенхимного происхождения; активацию мишеней сигнального каскада Notch при межклеточных взаимодействиях; вклад каждого клеточного типа в активацию программы остеогенной дифференцировки при сокультивировании.

Мы показали, что сокультивирование клеток эндотелия с клетками мезенхимного происхождения приводит к активации сигнального пути Notch, а также к активации проosteогенной программы дифференцировки даже в отсутствие специфических остеогенных факторов.

Исследование поддержано грантом РФФИ мол_а 18-34-00277.

МСК ПУПОВИНЫ И ПЛАЦЕНТЫ СПОСОБСТВУЮТ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОЙ ЭКСПАНСИИ КРОВЕТВОРНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ МОНОЦИТАРНОГО, НО НЕ ЭРИТРО-МЕГАКАРИОЦИТАРНОГО РЯДА

Костюнина В.С.¹, Северин И.Н.², Петёвка Н.В.^{1*}

1. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий, Минск, Беларусь

2. РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова, Минск, Беларусь

**npet@blood.by*

Цель работы – изучение закономерностей поддержки мезенхимными стромальными клетками (МСК) пуповины и плаценты субпопуляций прогениторов миелоидного ряда пуповинной крови *in vitro* и влияния уровня экспрессии подслоем МСК генов цитокинов на прирост клеток гранулоцитарно-моноцитарного и эритро-мегакариоцитарного ряда.

Материалы и методы. Экспансию CD34⁺ клеток пуповинной крови проводили в течение 5-6 суток на монослое МСК пуповины, плаценты или КМ в бессывороточной среде с цитокинами SCF, Flt3-l, TPO (n=6). Анализировали прирост колониеобразующих единиц гранулоцитов (КОЕ-Г), моноцитов (КОЕ-М), гранулоцитов-моноцитов (КОЕ-ГМ), мегакариоцитов (КОЕ-Мег) и суммы КОЕ и бурстобразующих единиц эритроцитов (КОЕ+БОЕ-Э). Методом ПЦР в реальном времени изучали уровень экспрессии МСК генов *g-csf*, *m-csf*, *epo*, *il-11*.

Результаты и обсуждение. Суммарный прирост КОЕ Г+ГМ+М увеличивался в ряду пуповина – плацента – КМ и составлял 90±20, 130±50 и 250±60 раз, соответственно, (p>0,05). Прирост КОЕ-М был статистически значимо выше прироста КОЕ-Г (p<0,01) для всех МСК. Прирост КОЕ+БОЕ-Э, соответственно, составил 10±3, 21±7 и 38±9 раз (p>0,05), причем различия между КОЕ Г+ГМ+М и КОЕ+БОЕ-Э в присутствии МСК КМ были статистически значимы (p<0,05). Прирост КОЕ-Мег при поддержке МСК КМ составил 16±3 раз, и значимо не отличался в присутствии МСК пуповины и плаценты. Выявлена корреляция между кратностью прироста суммы КОЕ М+ГМ и уровнем экспрессии гена *m-csf* в МСК пуповины, плаценты и КМ (r=0,71, p<0,05, n=8), тогда как корреляции экспрессии гена *g-csf* на уровне мРНК и белка с приростом КОЕ-Г нет. Экспрессия генов *epo* и *il-11*, регулирующих эритро- и мегакариоцитопоз, во всех культурах МСК была незначительной.

Вывод. МСК пуповины и плаценты, аналогично МСК КМ, в соответствии с уровнем экспрессии ими генов *m-csf*, *epo* и *il-11*, способствуют более выраженной экспансии предшественников моноцитарного, но не эритро-мегакариоцитарного ряда *in vitro*.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕД И ТРОМБОЛИЗАТА ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИМЕДИЦИНСКОГО КЛЕТОЧНОГО ПРОДУКТА

Котова А.В.^{1,2,3}, Шумеев А.Н.¹, Рюмина Н.А.¹, Золина Т.Л.¹, Иволгин Д.А.^{1,2}, Енукашвили Н.И.³

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

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

3. ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия.

* anastkotova@gmail.com

Получение первичных клеточных культур мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и их предварительная экспансия для производства биомедицинского клеточного продукта требуют высокого качества среды и стандартизации условий культивирования. Традиционное использование фетальной бычьей сыворотки становится неприемлемым из-за невозможности определения её точного состава и вероятности иммунных реакций при попадании в организм. Альтернативой сыворотке должна стать бессывороточная среда. В случае адгезивных культур, таких как МСК, использование некоторых бессывороточных сред требует дополнительной обработки культуральных флаконов для прикрепления клеток к субстрату, что существенно затрудняет получение культур в условиях GMP. Для решения этой проблемы предлагается использовать в качестве добавки к бессывороточной среде человеческий тромболизат.

Целью работы является изучение функциональных характеристик МСК пупочного канатика и жировой ткани при использовании бессывороточных сред в присутствии тромболизата человека (ЧТ) без стадии дополнительной обработки культурального пластика и бессывороточной среды, не требующей дополнительных процедур подготовки к культивированию.

Материалы и методы. В работе исследовали морфологию, иммунофенотип и пролиферацию МСК жировой ткани (МСК ЖТ) и пупочного канатика (МСК ПК) при культивировании в средах: 1) PowerStem MSC1 (PanBiotech) - бессывороточная среда, 2) StemPro MSC SFM XenoFree (Life Technologies) и 3) MSC NutriStem XF Medium (Biological Industries) – бессывороточные среды без компонентов животного происхождения, требующие обработки пластика; 4) DMEM Low Glucose, содержащая 10% ASCM Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (HyClone), использовалась в качестве контроля. Вместе со средами 2 и 3 использовали тромболизат человека Human Platelet Lysate (Stemcell Technologies) в конечных концентрациях 2% и 5%. Обработку культурального пластика не проводили. Морфологическую характеристику МСК

осуществляли при анализе фотографий случайно выбранных полей зрения (n=15), полученных с использованием светового инвертированного микроскопа. Методом проточной цитометрии определили иммунофенотип МСК и его соответствие минимальным критериям МСК (CD90+/CD105+/CD73+/ CD44+/CD34-/CD45-/CD14-/CD117-) на 1, 4 и 6 пассажах.

Результаты. Форма МСК ЖТ в процессе культивирования с использованием сред 2 и 3 отличалась от фибробластоподобной: некрупные клетки округлой и звездчатой формы с тонкими длинными отростками. Морфология основной части популяции МСК ПК во всех средах соответствовала МСК. При достижении монослоя морфология и иммунофенотип клеток соответствовали МСК во всех средах, однако в средах 2 и 3 среди МСК ЖТ обнаружались субпопуляции, не являющиеся МСК и экспрессирующие такие маркеры как CD117, CD34 и CD45. Среда 1 показала селективность для всех культур. Высокая активность пролиферации показана для клеток, культивируемых в средах 1 и 4. При достижении монослоя в среде 1 произошло отделение клеток от субстрата.

Вывод. Полученные результаты свидетельствуют о том, что человеческий тромболизат может быть альтернативой фетальной бычьей сыворотки, его использование позволяет не осуществлять дополнительную обработку пластика при использовании бессывороточных сред, что упрощает схему перемещения продукта в условиях GMP.

МИОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК АЛЬВЕОЛЯРНОЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА В 2D И 3D КУЛЬТУРЕ

Кошелева Н.В.^{1,2,3*}, Сабурина И.Н.^{1,3}, Горкун А.А.^{1,4}, Зурина И.М.^{1,4}, Пулин А.А.¹,
Еремин И.И.¹, Репин В.С.¹

1. *ФГБНУ НИИ Общей патологии и патофизиологии, Москва, Россия*
 2. *Биологический факультет ФГБОУ ВО МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
 3. *ФГБОУ ДПО Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования Минздрава РФ, Москва, Россия*
 4. *Институт регенеративной медицины ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*
- *n_kosheleva@mail.ru

Ключевой проблемой заместительной терапии дисфункций опорно-двигательного аппарата и миодистрофий остается доступность аутологичных источников клеточного материала, способного дифференцироваться в миогенном направлении. Целью исследования стало изучение спонтанной миогенной дифференцировки стромальных клеток альвеолярной слизистой оболочки полости рта в условиях 2D и 3D культур.

При стандартном монослойном 2D культивировании клетки имели фибробластоподобную форму, хорошо пролиферировали и по иммунофенотипу соответствовали мультипотентным мезенхимным стромальным клеткам (CD105+, CD90+, CD73+, CD29+, CD45-, CD34-, CD14-). В 40% культур на 3-4 пассаже происходила спонтанная миогенная дифференцировка, формировались многоядерные миотубы, показан синтез одного из ключевых регуляторов дифференцировки прогениторных клеток в миотубы и маркера начальных стадий миогенеза – MyoD. Саркомерный α -актин, характерный для дифференцированных мышечных клеток поперечно-полосатой и кардиальной мускулатуры, отсутствовал или в незначительном количестве был распределено равномерно по цитоплазме.

В условиях 3D культуры на специальных агарозных планшетах (Microtissue, USA) из стромальных клеток слизистой оболочки полости рта за сутки формировали компактные сфероиды. Во всех сфероидеях через 7 суток наблюдали спонтанную дифференцировку клеток в миогенном направлении с образованием мышечных трубочек. В дифференцированных сфероидеях отсутствовали ранние прогениторные клетки, не синтезировался MyoD и присутствовали не единичные миотубы, а более дифференцированные сформированные миофибриллы с характерным расположением ядер по периферии и поперечной исчерченностью, выявляемой окрашиванием антителами к белку саркомерного α -актина.

Обнаруженный высокий миогенный потенциал изученных клеток может быть связан с онтогенетическим происхождением полости рта и особенностями функционально-механической нагрузки.

Таким образом, установлен высокий миогенный потенциал стромальных клеток слизистой оболочки полости рта, при культивировании в 3D условиях миогенная дифференцировка проходила со слиянием мышечных трубочек в миофибриллы, что характерно для организованной мышечной ткани.

Исследование было поддержано Российским научным фондом (грант № 17-75-30066).

НИША СТВОЛОВОЙ КЛЕТКИ: НОВЫЙ УНИКАЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Макаревич П.И.^{1, 2*}, Ефименко А.Ю.^{1, 2}, Еремичев Р.Ю.¹, Нимирицкий П.П.^{1, 2}, Сагарадзе Г.Д.^{1, 2}, Александровская Н.А.^{1, 2}, Ткачук В.А.^{1, 2}

1. *Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.*

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

*pmakarevich@mc.msu.ru

Большинство клеток взрослого организма неспособно к постоянному самообновлению в физиологических условиях. Однако с течением времени клеточный состав любой ткани требует обновления, а при восстановлении тканей после повреждения потребность в новых клетках резко возрастает. В постнатальном периоде за эти процессы в организме отвечают стволовые клетки (СК), которые обладают двумя ключевыми свойствами - способностью к самообновлению и дифференцировке в определенные типы специализированных клеток или *потентностью*.

Процесс обновления клеток в ткани должен находиться под строгим контролем, важно, чтобы лишь малая часть клеток организма обладала способностью неограниченно самообновляться и их функции точно регулировались. С этой целью СК в организме неавтономны, их способность к самообновлению и дифференцировке управляется особым микроокружением, называемым "ниша стволовой клетки". Комплекс СК и её ниши является функциональной единицей регенерации, а ниша - своеобразным интерфейсом между организмом и СК.

В докладе будут затронуты как новые данные о важности участия компонентов ниши СК в регенерации, так и подходы к ее моделированию *ex vivo* и данные об участии МСК из различных источников в формировании ниши и ее регуляции. В частности, будут представлены данные о модуляции активности МСК при формировании автономного микроокружения, а также раскрыты механизмы, с помощью которых МСК способны брать на себя регуляторные функции в ряде специализированных ниш (в частности, сперматогенной ниши яичка). Наконец, предполагается, что ниша является одной из самых перспективных мишеней для терапевтического вмешательства, в т.ч. и для стимуляции эндогенных процессов регенерации и обновления ткани.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и при поддержке гранта РФФИ №14-07/01452.

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ФУНКЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ЕЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

И.Ю. Маклакова^{1, 2}, Д.Ю. Гребнев^{1, 2}, В.Ч. Юсупова², Е.А. Примакова³

1. *ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия*

2. *ГАУЗ СО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия*

3. *РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ 9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь*

**makliu@mail.ru*

Согласно современным представлениям старение сопровождается не только уменьшением количества стволовых клеток в организме, но и что еще более значимо – уменьшением их чувствительности к факторам роста. В данном исследовании изучались биохимические показатели, характеризующие регенерацию печени на фоне введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). Эти исследования проведены на зрелых и старых лабораторных животных.

Эксперименты выполнены на 54 белых зрелых лабораторных мышцах-самцах, и 54 старых. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены из хориона плаценты 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, срок гестации 14 дней. Культивирование ММСК проводилось в условиях CO₂ – инкубатора при температуре 37°C с содержанием углекислого газа 5% и влажностью 90%. Животным опытных подгрупп внутривенно вводилась суспензия ММСК в дозе 4 млн. кл/кг, контрольным подгруппам вводили 0,9% раствор NaCl – 0,2 мл. Резекция 70% печени выполнена по методике С. Mitchell, Н. Willenbring. Трансплантация клеток осуществлялась в воротную вену сразу же после резекции печени однократно. Производилась оценка биохимических показателей периферической крови на 1, 3, 7 сутки после трансплантации клеток.

Проведенные исследования свидетельствуют о способности старых лабораторных животных отвечать на трансплантацию ММСК после резекции печени уменьшением степени выраженности цитолиза гепатоцитов. Проводя сравнительный анализ биохимических показателей зрелых и старых лабораторных животных после резекции печени, следует отметить более выраженный ответ зрелых животных в отношении способности печени к синтезу мочевины.

ОСТЕОГЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА КЛЕТОК ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПАТОЛОГИЙ СЕРДЦА И СОСУДОВ

Малашичева А.Б.^{1,2*}, Костина А.С.¹, Семенова В.С.^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр им. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*amalashicheva@gmail.com

Остеогенная дифференцировка – многоступенчатый процесс, этапы которого протекают сходно при образовании костной ткани в норме и при кальцификации сосудов и клапанов сердца при патологии и старении. Гены и соответствующие белки, которые накапливаются на продвинутых стадиях остеогенной дифференцировки, относятся к семействам WNT, BMP и RUNX. Факторы активации генов и клеточных сигнальных путей на ранних этапах остеогенной дифференцировки как в норме, так и при патологической кальцификации остаются слабо изученными. Расшифровка ранних механизмов запуска остеогенной дифференцировки важна с точки зрения возможности управления этой дифференцировкой – для индукции остеогенеза, когда необходимо образование костной ткани, либо для предотвращения при различных патологиях, связанных с кальцификацией тканей. Целью нашей работы является поиск ранних инициаторных механизмов остеогенной дифференцировки клеток мезенхимного происхождения, приводящих к патологической кальцификации тканей сердца. В работе использован спектр клеток мезенхимного происхождения: мезенхимные клетки жировой ткани человека, мезенхимные клетки сердца человека и крысы, интерстициальные клетки аортального клапана, гладкомышечные клетки аорты. Исследована роль сигнального пути Notch в активации остеогенных путей дифференцировки клеток и соответствующих генов. Сделаны выводы о потенциальной роли компонентов сигнального пути Notch в опосредовании патологической кальцификации сердца и сосудов.

РАЗРАБОТКА БИОИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ИСКУССТВЕННОЙ РОГОВИЦЫ НА ОСНОВЕ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ И СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИМБА И СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА

Машель Т.В.^{1, 2*}, Александрова О.И.¹, Хорольская Ю.И.¹, Переплетчикова Д.А.^{1, 2}, Писугина Г.А.^{1, 3}, Журенков К.Э.^{1, 3}, Гаврилук И.О.⁴, Блинова М.И.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 2. ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия
 3. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
 4. ФГБОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия
- *t.mashel@ya.ru

Синдром лимбальной недостаточности (СЛН) – термин, объединяющий различные патологические процессы в эпителии роговицы, приводящие к потере зрения. Одним из методов терапии СЛН является трансплантация искусственных конструкций роговицы, представляющих собой различные скаффолды, заселенные стволовыми клетками (СК). Наиболее популярным вариантом такого скаффолда является амниотическая мембрана (АМ), однако к настоящему времени не разработан оптимальный способ её предподготовки, что приводит к низкому уровню клинического успеха.

Целью настоящего исследования является разработка методики криоконсервации и дезэпителизации АМ, позволяющей создать подходящие условия для успешного культивирования на ней СК. В работе использовались 3 различных варианта условий хранения и обработки АМ: нативная (гипотермическое хранение в растворах антибиотиков при +4°C), криоконсервированная при -20°C и криоконсервированная при -80°C. Дезэпителизация проводилась путём обработки трипсином и 96% р-ром этилового спирта. В качестве клеточного компонента биоинженерной конструкции на основе АМ использовали СК лимба и слизистой полости рта кролика и человека. Жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и функциональной активности.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что наиболее перспективным способом хранения и обработки можно считать криоконсервацию при -80°C с последующей обработкой АМ трипсином.

В дальнейшем планируется отработка и усовершенствование выбранной методики в целях создания оптимальных тканеинженерных конструкций для терапии СЛН.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ 14-50-00068.

ВЛИЯНИЕ ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА KLOTHO НА ХАРАКТЕРИСТИКИ РОСТА КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Мелехин В. В.^{1,2*}, Пономарев А. И.^{1,2,3}, Десятова М. А.¹, Дербышев Г. С.¹, Макеев О. Г.^{1,2}

1. ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Екатеринбург, Россия
 2. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
 3. ГАУЗ СО «Областная детская клиническая больница», Екатеринбург, Россия
- *melekhinvv@mail.ru

Ген klotho был идентифицирован в 1997 году группой ученых под руководством доктора М. Куго-о. Первоначально ген klotho воспринимался как ген «антистарения», снижая риск развития возраст-зависимых заболеваний путем нормализации обменных процессов и повышения антиоксидантной защиты. Впоследствии было отмечено, что экспрессия klotho также подавляет развитие различных онкологических заболеваний.

В настоящей работе проведена оценка влияния гиперэкспрессии гена секретируемой формы белка Klotho (sKL) на характеристики роста клеток глиобластомы человека. Показано, что гиперэкспрессия sKL существенно подавляет жизнеспособность и пролиферацию клеток глиобластомы человека. Между тем, данные эффекты сопровождались двукратным повышением в исследуемых клетках активности каспаз, а также ингибированием активности супероксиддисмутазы.

Таким образом, показана вовлеченность klotho в процессы канцерогенеза глиобластомы человека. При этом, возможные механизмы реализации противоопухолевого действия sKL через индукцию апоптоза и подавление антиоксидантной активности наводят на представления о противоречивости эффектов этого гена: подавляя различные показатели жизнеспособности опухолевых клеток, он одновременно повышает эти же показатели в нормальных клетках.

Тем самым, использование гена klotho для терапии онкопатологии может избавить от необходимости селективного воздействия непосредственно на клетки опухоли и открыть перспективы применения нормальных клеток, в том числе ММСК, для таргетинга конструкций с геном sKL.

STEM CELL RESEARCHES USING IMAGING FLOW CYTOMETRY

Hughes O.

Amnis/Merck, United Kingdom

The ImageStream system combines high-speed image capture with image quantification to create a statistically powerful microscopy platform, enabling robust discrimination of cells based on their appearance.

The ImageStream assay distinguishes erythroid progenitor populations in murine bone marrow using image analysis of both intensity as well as morphology parameters. The mean pixel intensities (total intensity divided by area of the intensity) of Ter119 and DRAQ5 are used in combination with nuclear size (area) to classify erythroid populations. The multispectral imaging of cells in flow, in adherent cultures or in tissues will be an important new tool that can be used with standard flow cytometry as well as histologic microscopy. The power to analyze the images of large numbers of cells will greatly improve our ability to detect complex and relatively rare populations compared to standard histological approaches. Quantitation of sub-cellular and complex morphologic features alongside multiple measurements of fluorescence intensity will also greatly improve our understanding of the cells analyzed by flow cytometry.

The ImageStream assay also can identify very small embryonic-like stem cells (VSELs) in bone marrow by using a combination of morphology and intensity parameters. The aspect ratio (shape) and area (size) parameters are used to identify round cells. Round cells are analyzed for the absence of lineage staining and a larger nucleus:cytoplasm ratio. Cells with a larger N/C ratio are then identified as Sca-1+ VSELs. In agreement with microscopic results, the IS analysis confirmed the very small size of murine BM-derived VSELs, estimated at $<5\mu\text{m}$ ($3.63\pm 0.09\mu\text{m}$), while the size of Sca-1+/Lin-/CD45+ HSCs (controls) was $>6\mu\text{m}$ ($6.54\pm 0.17\mu\text{m}$). Via DNA staining of sorted VSELs, IS allowed us to assess their purity and distinguish them easily from larger cell fragments, platelets, or small CD45- differentiated cells from erythroid lineage.

This ImageStream assay can quantify cell size from various populations of differentiated hESCs by measuring the pixel area of the brightfield channel. Cells gated on CD34 bright/CD31+, CD34 dim/CD31+, and CD34dim/CD45 are measured for average brightfield pixel area. Population analysis using image scanning flow cytometry confirmed analysis by standard flow cytometry, where CD34+CD31+ cells could be divided into both bright and dim CD34-expressing cells, whereas CD34+CD45+ cells were exclusively CD34dim. One nontrivial result of these studies is to clearly demonstrate that phenotypic double positive cell populations are not due to

cell doublets or other aggregates. Indeed, since the frequency of CD34⁺CD45⁺ cells can be relatively low at early time points during differentiation of hESCs, this finding that is typically assumed, but not always definitively demonstrated by standard flow cytometric analysis, becomes especially important. Image scanning flow cytometry also clearly demonstrates by histograms based on cell size distribution that cells within the CD34^{bright}CD31⁺ population had a higher mean cell size compared with cells within the CD34^{dim}CD31⁺ and CD34^{dim}CD45⁺ cell populations, providing a novel means to depict morphologic differences between the CD34^{bright} and CD34^{dim} hESC-derived cells.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА МОДИФИЦИРОВАННЫХ АМИНОКИСЛОТАМИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛАХ

Нащекина Ю.А.*, Юдинцева Н.М., Чабина А.С., Блинова М.И., Михайлова Н.А.

ФГБНУ Институт цитологии» РАН, Санкт-Петербург, Россия

*ulychka@mail.ru

Использование тканеинженерных конструкций, представляющих собой биodeградируемые полимерные носители, заселённые клетками, в настоящее время находит широкое применение в регенеративной медицине. Интерес представляют деградируемые материалы на основе полигидроксиэфиров. Однако поверхность таких синтетических полимерных материалов является чужеродной для живых клеток и препятствует их нормальному функционированию и росту. Модификация полимерных носителей, предназначенных для культивирования и трансплантации клеток, является ключевым этапом тканевой инженерии. Одним из перспективных методов модификации полигидроксиэфиров является обработка их природными аминокислотами, которые являются источниками аминокислот – лизином и аргинином. Целью настоящей работы является изучение функциональной активности мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК), культивируемых на модифицированных аминокислотами полимерных носителях.

В ходе выполнения работы были отработаны оптимальные условия связывания лизина и аргинина с полимерной поверхностью. Методом нингидриновой реакции показано, что нагревание до 40°C и присутствие изопропилового спирта в рабочем растворе способствует связыванию аминокислот с полимерной поверхностью. Также было выявлено, что присутствие аминокислот положительно влияет на количество жизнеспособных клеток, культивируемых на модифицированных носителях. Обнаружена прямо пропорциональная зависимость между количеством связанных с полимерной поверхностью аминокислот и адгезионной, а также пролиферативной активностями МСК. Степень распластанности МСК, а также количество сайтов связывания с поверхностью, визуализируемых с помощью окраски на винкулин, было существенно выше у клеток, культивируемых на модифицированных аминокислотами носителях по сравнению с интактной полимерной поверхностью.

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

РУБЕЦ НА МАТКЕ И МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ – ПЕРСПЕКТИВЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МИОМЕТРИЯ

Остроменский В.В.^{1*}, Енукашвили Н.И.^{3,2}, Дикке Г.Б.¹, Кучерявая Ю.Г.¹, Астапова М.К.¹

1. ЧОУ ДПО «Академия медицинского образования им. Ф.И. Иноземцева» Кафедра акушерства и гинекологии с курсом репродуктивной медицины, Санкт-Петербург, Россия
 2. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия
 3. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
- *ostromenskyvv@gmail.com

Рубец на матке является одной из актуальных проблем современного акушерства, оказывая негативное влияние на репродуктивную функцию на всех этапах её реализации. Процент данной патологии неуклонно растет, в связи с увеличением показаний к оперативному родоразрешению у современных женщин, хирургических вмешательств на матке, выполняемых в репродуктивном возрасте.

В настоящее время одним из направлений трансляционной медицины является использование стволовых клеток в качестве основы для клеточной терапии различных состояний.

Цель исследования: оценка влияния мезенхимальных стволовых клеток (МСК) периваскулярного пространства пупочного канатика человека на свойства экспериментального рубца на матке у крыс.

В ходе исследования была получена сравнительная характеристика эффективности использования различных матриц для МСК: раствора NaCl 0,9 %, натрия гиалуроната и геля на основе натрия карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Также оценивалось влияние гиалуроновой кислоты без клеточного субстрата на репаративную способность миометрия.

Методы исследования. Для введения использовали МСК периваскулярного пространства пупочного канатика человека при наличии информированного согласия родителей ребенка на использование клеток в научных целях. Объект исследования - самки альбиноса серых крыс породы Wistar. Всего прооперировано 40 животных. Модель: травма неизменной мышцы матки, нанесенная скальпелем. После в шов на левом роге матки у 10 крыс вводилась культура МСК на растворе NaCl 0,9 % (n=10, подгруппа А), другим 10 животным в шов на матке инъецировались МСК на основе геля с натрием КМЦ (n=10, подгруппа В), еще одной группе крыс МСК вводились на основе гиалуроната натрия (n=10, подгруппа С). Также отдельно была выделена группа,

где животным (n=10) в шов на левом роге матки инъектировалась гиалуроновая кислота без клеточного субстрата.

Рана на правом роге матки во всех 40 случаях дополнительному воздействию не подвергалась и являлась контрольной (n=40, контрольная группа). Выведение из эксперимента проводилось на 14-е сутки после операции.

Оценка результатов исследования проводилась с помощью шкалы гистологических изменений, учитывающая соотношение мышечной и соединительной ткани в области рубца, наличие и толщину фиброзных септ, степень инвазии миоцитов в область рубца, количество сосудов, а также толщину сосудистой стенки и калибр сосудов.

В результате оценки гистологических препаратов выявлены разнонаправленные тканевые изменения. Минимальная разница (по сравнению с контрольной группой) выявлена в миометрии при простом введении культуры клеток на физиологическом растворе. При анализе результатов у особей с введенной в рану гиалуроновой кислотой отмечена более выраженная васкуляризация рубца на матке, чем в контрольной группе. Введение культуры МСК на основе матрицы из КМЦ позволила добиться выраженной инвазии миоцитов в область рубца, однако также было выявлено появление фиброзных септ. Это позволяло механически укрепить область рубца, однако негативно сказывалось на его растяжении. Наиболее выраженные изменения выявлены в группе с внедренными МСК на матрице из гиалуроната натрия. В рубцах преобладала инвазия миоцитов (от умеренной до хорошей), а также ангиогенез (сосуды калибра от капилляров до мелких артериол). При этом отмечено, что стенки сосудов, в основном, полноценные (в отличие от сосудов в рубцах контрольной группы).

Сравнительная характеристика рубцов показала, что введение МСК без базовой матрицы практически не влияет на улучшение свойств рубца на матке. В то же время подбор оптимальной матрицы позволит в полной мере использовать свойства МСК для получения положительного эффекта.

Полученные данные могут позволить расширить возможности патогенетически обоснованной профилактики неполноценности рубца на матке.

РОЛЬ GDNF В НЕЙРАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ СТВОЛОВЫХ/ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК И ПОДДЕРЖАНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ НЕЙРОНОВ У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Павлова Г.В.^{1,2,3}, Шамадыкова Д.В.¹, Куст Н.Н.¹, Пантелеев Д.Ю.¹, Савченко Е.А.¹, Ревещин А.В.¹

1. ИБГ РАН, Москва, Россия

2. ФГАУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко» Минздрава России

3. ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Институт молекулярной медицины

GDNF-терапия может быть эффективна для восстановления и поддержания жизнеспособности дофаминергических нейронов, которые гибнут при нейродегенеративных заболеваниях или в результате ишемических инсультов. У человека обнаружено, по крайней мере, две изоформы GDNF, отличающиеся друг от друга размером про-области. Возможно, что pre- (α) pro-GDNF необходим для обычной выживаемости нейронов, а pre- (β) pro-GDNF служит системой SOS и экспрессируется во время травматического повреждения нейронов или при нейродегенеративных заболеваниях. Для изучения значимости pro-области для индукторных функций GDNF, а также ее необходимости для транспорта фактора из клетки, были получены несколько модификаций GDNF, отличающихся друг от друга наличием/отсутствием pre- и pro-областей. Конструкции с модифицированными GDNF были трансфицированы в клетки HEK293. Показано, что все изоформы GDNF секретируются из трансгенных клеток в среду. Эффективность модификаций GDNF, как нейральных индукторов тестировали на модели эмбрионального спинального ганглия крысы. Было показано, что удаление области «pro» существенно увеличивает эффекты GDNF в качестве стимулятора нейральной дифференцировки клеток-предшественников. При использовании другой модели исследования – модели эмбрионального диссоциированного спинального ганглия крысы – был проведен количественный анализ нейральных индукторных свойств модификаций GDNF. Показано, что одновременное удаление pre- и pro- областей повышает нейроиндукторную активность GDNF (mGDNF). Спинальные ганглии, культивируемые в присутствии среды, полученной после культивации трансгенных клеток, продуцирующих mGDNF, показывали активный рост β -3-тубулин-позитивных отростков уже на 4-ый день. Также мы показали нейротрофический эффект от воздействия mGDNF для клеток PC12 *in vitro* и доказали, что на этой модели также отростки являются бета-3 тубулин положительными. Чтобы подтвердить нейроиндуцированные свойства mGDNF на клетках человека, мы использовали клеточную линию нейробластомы. Было

обнаружено, что добавление mGDNF к среде, в которой культивируются клетки нейробластомы человека значительно увеличивает количество β III тубулин-положительных клеток в этой культуре.

На мышинной модели мы продемонстрировали положительное влияние mGDNF на дофаминергические нейроны в зоне черной субстанции *in vivo*. Использовали модель болезни Паркинсона, которая была получена путем подкожной инъекции MPTP мышам линии C57Bl/6. Имплантация клеток, продуцирующих mGDNF в *caudateum-putamen*, сглаживала симптомы болезни Паркинсона в тестах двигательной активности и увеличивала количество тирозингидроксилаза-положительных клеток в области черной субстанции.

Работа поддержана программами фундаментальных исследований президиума РАН МКБ и «Фундаментальные основы технологии физиологических адаптаций».

ЭВОЛЮЦИЯ ВЗГЛЯДОВ НА МЕХАНИЗМЫ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В СЕРДЦЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ РЕГЕНЕРАТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В КАРДИОЛОГИИ

Парфенова Е.В.^{1,2}, Дергилев К.В.¹

1. *ФГБУ Национальный Медицинский Исследовательский Центр кардиологии Минздрава России, Москва, Россия*

2. *Факультет Фундаментальной Медицины, МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

Одной из важнейших проблем современной медицины является сердечная недостаточность, увеличение частоты которой в последние годы приобретает характер эпидемии. Сегодня кардиология столкнулась с исчерпанием возможностей современных методов лечения существенно улучшить прогноз этих больных. Поэтому современная медицина оказалась перед серьезным вызовом, а именно необходимостью разработки средств, позволяющих восстанавливать необратимо утраченные при заболеваниях клетки миокарда, что диктует необходимость глубокого понимания механизмов регенеративных процессов в сердце. За последние 20 лет благодаря фундаментальным исследованиям произошли существенные изменения в понимании этих механизмов, параллельно с этим изменялись и подходы к стимуляции регенерации миокарда. В докладе рассматривается эволюция этих взглядов от первоначальных представлений о регенерации миокарда, как функции внесердечных стволовых клеток – клеток костного мозга, через представления о роли и механизмах участия резидентных стволовых клеток сердца в регенерации миокарда, роли паракринной активности стволовых клеток и внеклеточных везикул, высвобождаемых этими клетками, к представлениям о роли пролиферации существующих кардиомиоцитов, как основном механизме, ответственном за обновление миокарда в течение жизни и его ограниченную регенерацию при повреждении. В докладе рассмотрены перспективы восстановления утраченного миокарда с помощью современных подходов, включающих использование микроРНК для стимуляции пролиферации кардиомиоцитов, замещение утраченного миокарда кардиомиоцитами, полученными из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, и восстановление миокарда с помощью прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты, а также представлены свои данные о стимуляции регенеративных процессов в сердце с помощью эпикардальной трансплантации тканеинженерных конструкций из клеточных пластов, образованных прогениторными клетками сердца и генетически модифицированными МСК жировой ткани.

ВЛИЯНИЕ ЭКСОСОМ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, НА РЕГЕНЕРАЦИЮ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ ОСТРОГО ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ

Паюшина О.В.¹, Шевелева О.Н.¹, Буторина Н.Н.¹, Куринов А.М.¹, Евтушенко Е.Г.²,
Домацкая Е.И.¹

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

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

**payushina@mail.ru*

Трансплантация мезенхимных стромальных клеток (МСК) является перспективным подходом к регенерации печени. Хорошей альтернативой ей служит введение продуцируемых МСК экзосом, комплексно передающих клеткам-мишеням биоактивные молекулы. Целью работы явился анализ влияния экзосом от МСК жировой ткани человека на восстановление печени мыши после острого отравления четыреххлористым углеродом (ЧХУ).

Экзосомы получали путем дифференциального ультрацентрифугирования кондиционированной МСК среды. Осадок везикул растворяли в PBS. Размер и концентрацию везикул в полученных препаратах контролировали методом анализа траекторий наночастиц (НТА); везикулярную морфологию частиц подтверждали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. Присутствие микроРНК в препаратах оценивали методом ПЦР в реальном времени. Острое поражение печени мышей вызывали однократной ингаляцией ЧХУ, после чего в селезенку вводили экзосомы. Через 2 суток печень подвергали гистологическому и иммуногистохимическому исследованию, а также анализу экспрессии генов TNF- α , PCNA и TGF- β .

Полученные от МСК везикулы имели характерные для экзосом форму и размер и содержали микроРНК miR151, miR221 и miR486. В печени мышей, получивших экзосомы, через 2 суток после отравления выраженность некроза и апоптоза гепатоцитов, число активированных клеток Ито и уровень экспрессии гена провоспалительного цитокина TNF- α были меньшими, чем у нелеченных животных. Снижен был и митотический индекс гепатоцитов, что может отражать меньшую степень повреждения печени. Полученные данные свидетельствуют о том, что при острой интоксикации продуцируемые МСК экзосомы оказывают гепатопротективный эффект, выяснение механизмов которого требует дальнейших исследований.

Работа выполнена при поддержке Фонда перспективных исследований (аванпроект «Травма-А») с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им Н.К. Кольцова РАН.

МЕЗЕНХИМНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭНДОМЕТРИЯ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

Петросян М.А.^{1*}, Мележникова Н.О.¹, Домнина А.П.², Базиан Е.В.¹

1. Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

2. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*mariya@labpharm.spb.ru

Мультипотентные свойства мезенхимных стволовых клеток (МСК), полученных из различных источников, открывают широкие перспективы их применения в биомедицине. Целью нашего исследования явилось изучение возможности использования МСК эндометрия в качестве клеточной модели для изучения фармакологической активности аналогов женских половых стероидных гормонов.

Эндометриальные клеточные линии (ЭКЛ) получали из биоптатов ткани эндометрия человека и культивировали на среде DMEM/F₁₂ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Иммунофенотипирование проводили с помощью проточного цитофлуориметра. Для кариотипирования использовали QFH метод дифференциального окрашивания. Экспрессию рецепторов прогестерона и эстрогена определяли иммуноцитохимическим методом, а также методом ПЦР. Децидуальную трансформацию ЭКЛ проводили с помощью комбинаций эстрадиола и прогестерона, а также его новых аналогов, синтезированных в ФИЦ Биотехнологии РАН. Уровни экспрессии пролактина и протеина-1, связывающего инсулиноподобный фактор роста (IGFBP-1) определяли методом ИФА.

ЭКЛ демонстрировали позитивную экспрессию маркеров CD9, CD13, CD31, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, негативную – CD34, HLA-DR (II класса), CD45, устойчивую экспрессию рецепторов эстрогена и прогестерона, а также нормальный кариотип. При гормональном воздействии на ЭКЛ уровни секреции маркеров децидуализации – пролактина и IGFBP-1 повышались, причем в случае воздействия высокоактивных аналогов прогестерона в большей степени.

Мезенхимное происхождение, стабильный диплоидный кариотип, наличие экспрессии рецепторов женских половых стероидных гормонов, а также способность ЭКЛ подвергаться децидуальной трансформации под действием комбинации эстрадиола и прогестерона, а также его аналогов, открывает перспективы использования ЭКЛ в качестве клеточной модели для поиска новых гестагенных препаратов, широко востребованных в акушерстве и гинекологии.

CD105 – МАРКЕР МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ЭНДОТЕЛИЯ: SAME BUT DIFFERENT

Пиневи́ч А.А.^{1,2*}, Варта́нян Н.А.¹, Гря́зева И.В.¹, Смирнов И.В.¹, Самойлович М.П.^{1,2}

1. ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова», Санкт-Петербург, Россия

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

*agniapinevich@gmail.com

Эндоглин (CD105) – интегральный трансмембранный гликопротеин, корецептор белков семейства TGF- β , является одним из основных позитивных маркеров мезенхимных стволовых клеток (МСК) и клеток эндотелия сосудов. CD105 играет ключевую роль в сигнальных каскадах, определяющих состояние активации или покоя эндотелиальных клеток. Сведения о роли CD105 в биологии МСК весьма ограничены. Уровень экспрессии CD105 на МСК связывают с их способностью к дифференцировке и иммунорегуляторными свойствами. В результате ферментативного отщепления экстраклеточного фрагмента CD105 образуется растворимая форма эндоглина.

Целью исследования было сравнение экспрессии и динамики обновления CD105 на МСК, выделенных из жировой ткани, и эндотелиальных клетках линии EA.hy926. Уровень экспрессии мРНК CD105 оценивали методом обратной транскрипции и ПЦР в реальном времени. Присутствие CD105 на поверхности и внутри клеток выявляли методами проточной цитофлуориметрии и иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (МКАТ) против CD105, созданных в лаборатории. Концентрацию растворимого эндоглина в среде культивирования клеток измеряли в двухцентровом иммуноферментном анализе, разработанном на основе МКАТ.

Ген *Eng* имел одинаково высокий уровень экспрессии в МСК и эндотелиальных клетках. Мембранная форма CD105 также была выявлена более чем на 95% МСК и EA.hy926. На клетках эндотелия связывание CD105 с МКАТ сопровождалось интернализацией молекул эндоглина в составе иммунного комплекса. Часть молекул CD105 сбрасывалась с мембраны и была выявлена в ростовой среде. В результате за 24 часа происходило полное обновление CD105 на поверхности эндотелиальных клеток EA.hy926. На МСК связывание CD105 с МКАТ не сопровождалось интернализацией рецептора. Меченные МКАТ молекулы CD105 сохранялись на поверхности МСК до 96 часов. Сбрасывание CD105 с МСК в ростовую среду было значительно менее активным, чем на эндотелиальных клетках. При этом МСК и эндотелиальные клетки обладали одинаковым уровнем

экспрессии гена *MMP14*, кодирующего фермент, отвечающий за образование растворимой формы CD105.

Таким образом, несмотря на сходный уровень экспрессии CD105 эндотелиальными клетками и МСК, EA.hy926 обладают значительно более высокой скоростью обмена эндоглина на клеточной мембране. МСК сохраняют CD105 на поверхности мембраны в течение длительного времени и не захватывают эндоглин путем эндоцитоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 17-15-01230.

Сфера деятельности компании ЛабИнструментс - поставка лабораторного оборудования, аналитических приборов, расходных материалов для научных исследований и производства. Также компания осуществляет подбор общелaborаторного и вспомогательного оборудования для комплексного оснащения лабораторий биологического, химического и биотехнологического профиля, а также термоаналитического оборудования.

Основные поставщики компании ЛабИнструментс - ведущие американские и европейские производители: Eppendorf AG, New Brunswick Scientific, Labconco Corporation, Li-Cor, Linseis GmbH, Wheaton Inc., Sonics&Materials Inc. Это обеспечивает высокое качество поставляемой продукции и надежность предлагаемых технических решений.



Компания ЛабИнструментс предлагает услуги по комплексному оснащению лабораторий различного профиля оборудованием, аналитическими приборами, посудой и расходными материалами, имеются запасы оборудования и расходных материалов на московском складе по ряду наименований. Комплектация лабораторий осуществляется на базе американского каталога VWR International. VWR – один из крупнейших мировых поставщиков научного и общелaborаторного оборудования, мебели, комплектующих, химических реактивов.

Коллектив компании обладает большим опытом комплексного оснащения лабораторий для научных учреждений, биотехнологических и фармацевтических производств. Ориентируясь на индивидуальный подход к покупателям, сотрудники компании по Вашей заявке помогут приобрести,

доставить и ввести в эксплуатацию оборудование от производителей, не представленных на российском рынке.

Компания ЛабИнструментс обеспечивает полный комплекс услуг для решения задач, поставленных покупателем:

- сотрудники компании, имеющие большой опыт работы в научно-исследовательских учреждениях, помогут выбрать оборудование для решения конкретной задачи и подберут оптимальный вариант по соотношению цена-качество;
- компания осуществляет доставку оборудования от производителя до заказчика, используя отлаженную систему логистики;

- высококвалифицированные инженеры сервисной службы выполняют ввод в эксплуатацию, гарантийное и послегарантийное обслуживание приобретенного оборудования; ремонт и дальнейшее обслуживание приборов производства Labconco Corporation, New Brunswick Scientific, Linseis GmbH, Eppendorf AG, Wheaton Inc., Sonics&Materials Inc независимо от источника покупки, а также морозильного оборудования любых марок и года выпуска, возможен выезд инженера в регионы России.



Цель компании ЛабИнструментс - предложить покупателю разнообразный ассортимент качественных товаров и профессиональный сервис. А накопленный опыт, знания и желание развиваться дальше сделают предложение компании максимально выгодным для покупателя.

По всем вопросам Вы можете обращаться в офис компании:

Адрес: 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10 ИБХ РАН, корпус 32, офис 306

Тел.: +7 (499) 724-88-72
+7 (495) 223-48-15

Факс: +7 (499) 724-88-72
+7 (495) 223-48-15

e-mail: info@labinstruments.ru
sales@labinstruments.ru

www.labinstruments.ru
www.labinstruments.su

ООО «Биокоммерц» - официальный Российский дистрибьютор компаний:

Miltenyi Biotec GmbH (Германия) – магнитная сепарация клеток (клиника, R&D); проточная цитометрия, проточный сортинг, антитела, пробоподготовка, культивирование клеток, продукция для клинического применения;

Carpicorn Scientific (Германия) – среды, сыворотки и другие продукты для культивирования клеток;

Cellab GmbH (Германия) – автоматизированные биореакторные системы для выращивания клеток (адгезионных и суспензионных), продукции белков, тканевой инженерии, 3D-культивирования;

RanD S.r.l. (Италия) – оборудование для гипертермической интраперитонеальной химиоперфузии;

Rarecells SAS (Франция) – выделение циркулирующих опухолевых клеток;

Jafron Biomedical Co., Ltd. (Китай) – колонки для гемосорбции;

Kaneka Corporation (Япония) – основанные на принципе фильтрации системы для выделения МСК из костного мозга, а также для процессинга пуповинной крови.



ООО "Биокоммерц"

123592 г. Москва
ул. Кулакова, д. 20, стр. 1а, оф. 621
www.biocommerce.ru
тел.: +7 (495) 781-17-87
+7 (926) 522-65-43
факс: +7 (495) 781-17-87
e-mail: info@biocommerce.ru

БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ, ПОСЛЕ ЛОКАЛЬНОГО И ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ КРЫСАМ

Полтавцева Р.А.^{1*}, Корнев А.И.¹, Свищевская Е.В.²

1. ФГБУ НМИЦ АГП им. В.И.Кулакова Минздрава России, Москва, Россия

2. ФГБУН ИБХ РАН, Москва, Россия

*rimpol@mail.ru

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) обладают способностью дифференцироваться в различные популяции. Показано, что МСК оказывают иммуносупрессивное действие и могут быть использованы для лечения ряда заболеваний, в том числе аутоиммунных. Наиболее распространенный способ трансплантации – внутривенное введение, может быть ассоциирован с побочными эффектами, вызванными большими размерами МСК и отсутствием на их поверхности набора молекул адгезии, необходимых для трансмиграции через сосудистый эндотелий.

В данном исследовании изучали эффект МСК, полученных из Вартонова студня, на биораспределение в теле крысы после внутривенного или локального введений. Клетки нагружали технецием 99 (Tc99) и красным флуоресцентным красителем PKH26. Меченые клетки вводили в хвостовую вену или подкожно в основание хвоста по 5 млн на крысу. Биораспределение Tc99 анализировали прижизненно методом компьютерной томографии (КТ). Крыс забивали через 1 час (ч.) и 24 ч., для анализа забирали легкие, печень, ткань в месте локального введения МСК, готовили криосрезы, анализировали методом конфокальной микроскопии. Кровеносные сосуды окрашивали антителами к IgG крыс, меченных флуоресцентной краской ФИТЦ.

Методом КТ показали, что основной сигнал (95%) через 1 ч. регистрировался в легких, незначительное количество было найдено в печени > мочевом пузыре > почках > остальных тканях. Через 24 ч. после внутривенного введения 60% находилось в легких и 40% в печени. При локальном введении 95% сигнала локализовалось в месте введения через 1 ч и 24 ч. Конфокальный анализ показал тромбоз легочных артериол, дебрис клеток в капиллярах легких и в печени как через 1 ч., так и через 24 ч. Таким образом, при внутривенном введении МСК разбиваются в капиллярах, наличие сигнала в печени и других органах показывает вынос метки из легких фагоцитами, но не перераспределение живых клеток. Локальное введение МСК также приводит к гибели клеток, но безопасно для организма в целом.

SCAFFOLD-FREE THREE-DIMENSIONAL CONSTRUCTS FROM BONE MARROW STROMAL CELLS FOR CARTILAGE REGENERATION

Ponomarev I.¹, Wölfer K.¹, Hauspurg C.², Kammel A.², Barnewitz D.¹

1. Research Centre of Medical Technique and Biotechnology, Bad Langensalza, Germany

2. Thuringian Institute of Textile and Plastics Research, Rudolstadt, Germany

*jponomarev@fzmb.de

Introduction. For many years it has been known that the bone marrow stromal cells (BMSCs) have the potential to repair articular cartilage damages. Whether the use of BMSCs is practicable, will be discussed in this work using the equine model.

Material and methods. Equine BMSCs were isolated from *tuber coxae* aspirates using density gradient centrifugation. After cultivation and proliferation in monolayer cultures, cells were transferred into a three-dimensional structure without any artificial matrix, growth or differentiation factors. In order to produce scaffold-free transplants and extracellular matrix, the samples were exposed to undifferentiated manual mechanical pressure [1]. The scaffold-free three-dimensional constructs (SFTDCs) were analyzed after 4-6 weeks of cultivation. Chondrogenesis in SFTDCs was documented by macroscopic, biochemical, immunohistological and biomechanical analysis. Native equine joint cartilage was used as a control.

Results and conclusion. The biochemical results clearly demonstrate that three-dimensional scaffold-free constructs derived from mechanical stimulated BMSCs have a high amount of proteoglycan and collagen (20% and 40% of the native tissue, respectively). Also, histochemical findings reveal clear proteoglycan and collagen staining. Even though immunohistological analyses indicate the presence of collagen type I, collagen type II was the main component of extracellular matrix in SFTDCs. The biomechanical results show that the E-modulus of SFTDCs was about 40% of the native tissue E-modulus. All SFTDCs exhibit a remarkable size.

The presented results allow the conclusion that tissue engineered constructs created by scaffold-free technology of BMSCs can be applied in the rehabilitation of articular cartilage damages in veterinary and human medicine.

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ВВЕДЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ПРОТИВ АМАСР С ЦЕЛЬЮ ИММУННОЙ ТЕРАПИИ РАКА ПРОСТАТЫ

Попов Б.В.^{1*}, Петров Н.С.¹, Георгиева А.О.²

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский Национальный Исследовательский Университет Информационных Технологий, Механики и Оптики, Санкт-Петербург, Россия

*borisvp478@gmail.com

Alpha-метилацил-CoA рацемаза (АМАСР) катализирует β -окисление жирных кислот и синтез желчных кислот и сверхпродуцируется в ткани карцином различных органов, особенно часто при раке предстательной железы. Инактивация АМАСР сопровождается торможением роста опухолевых клеток. Опубликованные данные позволяют рассматривать АМАСР как функциональный маркер рака и мишень для противораковой терапии. В настоящей работе мы получили и охарактеризовали более 20 гибридом и моноклональных антител против изоформы 1А АМАСР человека. Путём биопэннинга фаговой пептидной коммерческой библиотеки против собственных 6Н9, 2А5 и коммерческих антител 13Н4 к АМАСР были отобраны 10 фаговых мимотопов, распознающих каждый из указанных типов антител. Используя программу Pepitope и кристаллическую структуру АМАСР *Mycobacterium tuberculosis*, мы впервые установили, что эпитопы АМАСР, распознаваемые специфическими антителами, представляют собой нелинейные последовательности и локализуются внутри каталитического центра его молекулы. Мы использовали внутриклеточное введение аффинно очищенных собственных и коммерческих моноклональных антител против АМАСР в различные типы клеток установленных линий человека, используя коммерческий препарат PULSin (Polyplus-transfection Inc., France) и метод iTOP (induced transduction by osmocytosis and propanebetaine). В докладе обсуждается эффективность введения антител и возможность их использования в противораковой иммунной терапии. Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00251 и Программой фундаментальных исследований Президиума РАН № 32 «Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий».

ВОЗМОЖНОСТИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ В ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ ХРОНИЧЕСКИМИ ГЕПАТИТАМИ

Приходько Е.М.^{1,2,3}, Адылов Ш.Ф.³, Селиверстов П.В.², Радченко В.Г.², Хурцилава О.Г.²

1. Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
2. СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
3. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия

На сегодня лечение хронических гепатитов является актуальной проблемой гастроэнтерологии. Несмотря на разработку и применение современных гепатопротекторов, вопрос прогрессирования фиброза и развития цирроза печени, стоит очень остро.

Нами обследовано 100 пациентов с НАЖБП и аутоиммунным гепатитом (АИГ). Пациенты были рандомизированы на две группы. Контрольная группа (КГ) получала стандартное лечение (адеметеонин в дозе 400 мг/сут, при АИГ преднизолон в дозе 30 мг/сут). Пациентам основной группы (ОГ) помимо стандартной терапии, назначали внутривенное введение моноклеарной фракции пуповинной крови из расчет 1 млн клеток на 1 кг массы тела. Срок наблюдения составил 12 месяцев. Для оценки эффективности терапии нами выполнялись следующие исследования: КАК, биохимический анализ крови, морфологическое и иммуногистохимическое исследование биоптатов печени.

Результаты исследования: В ОГ наблюдалась более быстрая нормализация активности АЛТ и АСТ в первый месяц после начала терапии, а полная нормализация показателей синдрома цитолиза и холестаза была отмечена к 3 месяцу лечения. В КГ, нормализация показателей цитолиза и холестаза отмечалась к 6 месяцу после начала терапии. Также в ОГ отмечалось увеличение числа Т-хелперов (CD 3+, CD 4+), и уменьшение Т-цитотоксических лимфоцитов, как относительного, так и абсолютного их показателей, а также значительное увеличение ИЛ-8 в спонтанной и индуцированной активности в сыворотке крови. При исследовании биоптатов печени выявлено уменьшение CD3 Т-лимфоцитов, CD8 Т-лимфоцитов, и увеличение CD68 Т-лимфоцитов, что свидетельствует о снижении воспалительной гистио-лимфоцитарной инфильтрации ткани печени. В ГС отмечалось сохранение прежнего уровня показателей, что свидетельствует о сохранении степени воспаления в ткани печени.

Выводы. Терапия ХГ в сочетании стандартной терапии с использованием моноклеарной фракции пуповинной крови является наиболее эффективной.

ГИДРОГЕЛЬ ИЗ ДЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗОВАННОГО ВАРТОНОВА СТУДНЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Рябов В.М.*, Калужная Л.И., Шперлинг М.И., Спокойная К.Л.

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

**ryabovvma@mail.ru*

Проблема создания гидрогеля для 3D-биопечати, отвечающего основным требованиям – биосовместимости, нецитотоксичности, биоразлагаемости, наличию сайтов прикрепления клеток, молекул для стимуляции их миграции, ангиогенеза – состоит в поиске оптимального биоматериала. Компоненты из тканей млекопитающих, синтетические полимеры, исследуемые в настоящее время как основы гидрогелей, имеют некоторые преимущества и существенные недостатки из-за рисков иммунологических реакций, передачи инфекционных агентов, или из-за неспособности обеспечить дальнейшее функционирование клеток. Поиск оптимального биоматериала для производства гидрогеля должен быть сфокусирован на гомологичном источнике, содержащем все необходимые компоненты для клеток.

Таким источником видится Вартонов студень (WJ) пуповины человека - твердая слизистая соединительная ткань с уникальными биохимическими характеристиками, необходимыми для гидрогеля. Она богата коллагеном, гиалуроновой кислотой, сульфатированными гликозаминогликанами, содержит пептидные факторы роста, управляющие клеточной пролиферацией, дифференцировкой, синтезом и ремоделированием внеклеточного каркаса. Полученная после процесса децеллюляризации Вартонова студня 3D-структура обеспечивает поддержку культуры недифференцированных мезенхимальных клеток. Известны особые регенераторные свойства внеклеточного каркаса пуповины разных сроков гестации.

В связи с этим мы выдвигаем идею получения гидрогеля для 3D-биопечати из бесклеточного каркаса WJ. В процессе получения бесклеточного каркаса пуповину фрагментируют, подвергают воздействию детергентов и ферментов, остатки которых тщательно удаляют; каркасы подвергают лиофилизации, стерилизации. Для *in vivo* применения измельченный порошок солюбилизируют для превращения в прегель, который в физиологических условиях превращается в гель с определенной жесткостью, заполняющий дефект. Немаловажно и то, что пуповина как провизорный орган утилизируется как отход, поэтому является дешевым доступным источником сырья, использование ее уменьшает количество биологических отходов.

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОПТИМИЗАЦИИ ПРОЦЕССОВ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ, ХРЯЩЕВОЙ И СУХОЖИЛЬНОЙ ТКАНЕЙ

Савинцев А.М.^{1,2,3*}, Багаева В.В.^{2,3}, Малько А.В.¹

1. ГБУЗ «Городская Покровская больница», Санкт-Петербург, Россия
 2. ООО «Покровский банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия
 3. Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
- *almisav@yandex.ru

Введение. За последнее время медицина получила большой объем научно-практических сведений о физиологической и репаративной регенерации костной ткани. Репаративная регенерация представляет собой более быстрый по времени процесс, необходимый для выживания индивида. Процесс репаративной регенерации вовлекает воспалительный клеточный каскад, приводящий к депозиции матрикса, а затем к ремоделирующим процессам, которые обуславливают регенерацию поврежденных тканей в организме.

Цель исследования - оценить эффективность применения клеточных технологий в качестве дополнительной процедуры (регенеративной терапии) к хирургическому лечению пациентов с повреждениями и заболеваниями опорно-двигательной системы человека.

Материалы и методы. Под нашим наблюдением и лечением с 2007 до настоящего времени находится 45 пациентов с различными повреждениями и заболеваниями опорно-двигательной системы. Характер повреждений был следующий: 3 – ложные суставы и длительно не срастающиеся переломы длинных трубчатых костей; 2 – внутрисуставные переломы мыщелков большеберцовой кости со смещением отломков; 2 – закрытые переломы таранной кости; 2 – закрытые оскольчатые переломы диафиза длинных трубчатых костей; 11 – закрытые переломы проксимального отдела бедра; 5 – закрытые подкожные повреждения ахиллова сухожилия; 1 – дефект мягких тканей; 18 – остеоартрозы коленного и тазобедренного суставов; 1 – хронический бурсит. Мужчин было 18, женщин – 27. Возраст больных варьировал от 21 до 90 лет.

Сроки введения клеточного материала от 1 до 3 недель после травмы.

Результаты и обсуждение. Нами были предприняты попытки оптимизации процессов сращения при переломах костей и повреждениях ахиллова сухожилия посредством применения клеточных технологий на основе аутологичной мононуклеарной фракции костного мозга или мезенхимных стволовых клеток жировой ткани. Были подобраны количественные и временные параметры введения клеточной фракции. Во всех случаях были получены положительные

результаты, заключающиеся в гарантированном сращении переломов и сухожилий в минимальные для данной локализации сроки, что, по нашему мнению, обусловлено местным оптимизирующим воздействием введенного клеточного материала.

Процесс репаративной регенерации костной ткани оценивали в динамике по результатам рентгенологического обследования через 6, 12 и 24 недели.

Выводы. Результаты клинического применения клеточных технологий свидетельствуют о том, что при трансплантации клеточного материала в место перелома он обладает выраженным остеоиндуцирующим и оптимизирующим действием на течение процессов регенерации костной, хрящевой и сухожильной тканей и может быть использован в клинической практике в качестве дополнительной процедуры к хирургическому лечению больных с повреждениями опорно-двигательной системы, что позволяет повысить эффективность основного способа лечения и сократить сроки реабилитации больных после травмы.

ВНУТРИАРТЕРИАЛЬНАЯ ТРАНСПЛАНТАЦИЯ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МОЗГА У КРЫС

Салихова Д.И.^{1*}, Леонов Г.Е.¹, Наместникова Д.Д.³, Губский И.Л.³, Бухарова Т.Б.¹,
Сухинич К.К.⁴, Мельников П.А.⁵, Черкашова Э.А.³, Ефремова А.С.¹, Губский Л.В.³,
Ярыгин К.Н.⁶, Киселев С.Л.^{1,2}, Гольдштейн Д.В.¹

1. ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия
2. ФГБУН «Институт общей генетики им. В. И. Вавилова» РАН, Москва, Россия
3. ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия
4. ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия
5. ФГБУ Национальный медицинский центр психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, Москва, Россия
6. ФГБУН Научно-исследовательский институт Биомедицинской Химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия

**diana_salikhova@bk.ru*

Сегодня новым подходом к лечению ишемического инсульта является клеточная терапия с использованием стволовых клеток различных типов. Нейрональные прогениторные клетки (НПК), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК), согласно данным последних исследований, могут оказывать положительный терапевтический эффект при ишемическом инсульте без иммунологического отторжения и этических проблем.

Целью работы является получение НПК и оценка их терапевтической эффективности при внутриартериальном введении крысам с моделью экспериментального инфаркта мозга.

Ключевые слова: ИПСК, НПК, ишемический инсульт, трансплантация.

Материалы и методы. Для выбора способа получения НПК сравнивали различные условия дифференцировки, отличающиеся методом культивирования (2D или 3D-система) и составом сред. ИПСК культивировали в среде E8 Medium на подложке из матригеля и ламинина/поли-L-орнитина или формировали эмбриоидные тельца. Среду для получения нейрональных стволовых клеток делали на основе DMEM/F12, 1% N2 с добавлением 10 мкМ SB431542, 2 мкМ дорсоморфина и 80 нг/мл Noggin/100 нМ LDN193189. Для получения НПК клетки культивировали в среде DMEM/F12, 2% B27, 10 нг/мл FGF-2, 1 мкМ пурморфамин. Количество НПК оценивали по наличию PAX6+ клеток, выявляемых с помощью проточной цитометрии.

Крысам линии Wistar (n=22) выполняли эндovasкулярную транзиторную (90 мин) окклюзию правой средней мозговой артерии, после чего через 24 ч

экспериментальной группе животных (n=12) вводили НПК (5×10^5 клеток/1мл) в правую внутреннюю сонную артерию. В течение 14 суток у животных оценивали выживаемость, неврологический дефицит (НД) и объем очага инфаркта мозга методом МРТ.

Результаты. Наиболее эффективно ПСК были получены в 3D системе при использовании среды, содержащей LDN193189 ($82 \pm 4\%$) в отличие от применения Noggin и других дифференцировочных молекул, (не более 60%). В результате внутриартериальной трансплантации НПК, полученных по выбранному протоколу с LDN193189, повышалась выживаемость животных, уменьшалась степень выраженности НД, статистически достоверно уменьшился объем очага инфаркта по сравнению с группой контроля.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № 14.604.21.0184 RFMEFI60417X0184)

ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКОЙ НИШИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ ЛИМФОЛЕЙКОЗЕ И МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМЕ

Семенова Н.Ю.*, Бесмельцев С.С., Грицаев С.В., Ругаль В.И.

ФГБУ Российский НИИ гематологии и трансфузиологии ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

*semenova@mlc.lab

Нормальное кроветворение осуществляется в тесной взаимосвязи со стромальным микроокружением, которое формирует гемопоэтическую нишу. Эндостально-васкулярные элементы стромы костного мозга регулируют развитие гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) и их лимфоидную дифференцировку. Подавляющее большинство В-лимфоидных неоплазий представлено двумя нозологическими формами – хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и множественной миеломой (ММ), которые до настоящего времени неизлечимы, и их генез окончательно не установлен.

Цель исследования: Оценить организацию стромального микроокружения, формирующей гемопоэтическую нишу костного мозга (КМ), в условиях злокачественной трансформации В-лимфоцитоза у больных хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ) и множественной миеломой (ММ).

Материал и методы: В настоящей работе проанализирован материал от 96 пациентов с ХЛЛ (56 м./40 ж., медиана возраста 60) и от 32 пациентов с ММ (16 м./14 ж., медиана возраста 56 лет). В работе использовались морфологические, иммуногистохимические и морфометрические методы исследований.

Результаты. У всех пациентов установлены изменения стромального микроокружения КМ: увеличение плотности микрососудов, количества эндостальных стромальных клеток, усиление ретикулинового фиброза.

При ХЛЛ и ММ встречались три типа инфильтрации КМ опухолевыми клетками – нодулярный, интерстициальный, диффузный. В обеих группах пациентов (ХЛЛ и ММ) нами были отмечены более ярко выраженные морфологические признаки у пациентов с диффузной инфильтрацией КМ. Показано увеличение ретикулиновых волокон, с заметным формированием очагов склероза при интерстициальном и диффузном типах, включая эндостальные зоны. У пациентов с ХЛЛ при диффузной инфильтрации площадь сосудов увеличилась почти в 2 раза по сравнению с контрольной группой ($17,9 \pm 4,7\%$ вместо $9,1 \pm 1,2\%$), у пациентов с ММ также отмечалось увеличение плотности микрососудов ($15,4 \pm 1,8$; вместо $9,1 \pm 1,2\%$), и, что особенно важно, большинство сосудов визуализируются в субэндостальных пространствах. Анализ эндостальных

клеток у пациентов с ХМЛ 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, а также изменение морфологии клеток. Похожие данные получены при диффузной инфильтрации у пациентов с ММ ($2,5 \pm 0,3$).

Наблюдается тенденция к изменению экстрацеллюлярного матрикса эндостальных и периваскулярных зон, что подтверждается ИГХ исследованиями коллагена III и IV типов.

У пациентов с ММ повышенный ангиогенез коррелирует с количеством плазматических клеток в миелограмме ($r=0,58$; $p<0,05$), с типом инфильтрации КМ ($r=0,85$; $p<0,05$), а также с остеодеструктивными изменениями в анамнезе больного ($r=0,65$; $p<0,05$).

Заключение. Очевидно, что дефекты структур формирующих гемопозитическую нишу могут быть значимым патогенетическим фактором неопластической трансформации В-лимфоцитов и в таких условиях функция ниши может быть направлена на поддержание лейкозного клона.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ СРЕДИ ОБРАЗЦОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ ПОКРОВСКОГО БАНКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Сказина М.А.^{1,2*}, Дудолодова А.А.¹, Котелевская Е.А.^{1,2}, Адылов Ш.Ф.¹

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

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

*skazina@stemcellbank.spb.ru

На сегодняшний день одним из успешных методов лечения заболеваний системы кроветворения является трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Лимитирующим фактором при трансплантации ГСК является совпадение донора и реципиента по системе главного комплекса гистосовместимости: HLA-генотип служит основным критерием при подборе донора. Создание банков пуповинной крови расширяет возможности неродственной алогенной трансплантации ГСК. Так как HLA-фенотип различается у представителей разных национальностей и этнических групп, информация о частоте аллелей локусов HLA в популяции облегчает поиск доноров, повышает доступность и снижает стоимость материала для трансплантации.

Целью данной работы является оценка частот аллелей и гаплотипов генов главного комплекса гистосовместимости I и II класса (HLA-A, -B, -DRB1) у жителей Северо-Западного региона Российской Федерации на примере выборки образцов пуповинной крови банкированных в ООО «Покровском банке стволовых клеток».

Из 1436 образцов пуповинной крови была выделена ДНК с помощью набора Protrans DNA Vox 500 (Германия). HLA-типирование низкого разрешения проводилось методом ПЦП-SSP (sequence-specific priming) с применением циклерплатных систем Protrans и BAGHealthcare (Германия). Частоты встречаемости аллелей и гаплотипов рассчитывали в программе Arlequin35.

Всего было обнаружено 18 аллелей по локусу HLA-A*, 28 HLA-B* и 13 HLA-DRB1*. Среди них выявлены следующие наиболее часто встречающиеся аллели: HLA-A*02 – 30%, *03 – 15%, *24 – 12%; HLA-B*07 – 13%, *35 – 11%, *44 – 8%, HLA-DRB1*15 – 14,9%, *07 – 14,6, *13 – 14,5%. Частота наиболее распространенных гаплотипов составляет: HLA-A*03-B*07-DRB1*15 – 0,38%, HLA-A*01-B*08-DRB1*03 – 0,33%, HLA-A*03-B*35-DRB1*01– 0,3%. Для 60 образцов были получены данные об HLA-генотипе других членов семьи, в результате чего был выявлен случай рекомбинации в локусе HLA-A.

Полученные результаты распределения генетического полиморфизма HLA-A, -B, -DRB1 локусов у жителей Северо-Западного региона Российской Федерации могут дополнить имеющиеся информационные базы данных по популяционной генетике и по ассоциированным заболеваниям, а так же стать заделом для создания собственного регистра доноров ПК в Северо-Западном регионе Российской Федерации.

ИММОРТАЛИЗОВАННЫЕ ЛИНИИ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ НЕ СПОСОБНЫ РЕПРОГРАММИРОВАТЬСЯ В ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ

Скворцова Е.В.^{1*}, Синенко С.А.¹⁻², Томилин А.Н.¹.

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

*e.skvortsova@incras.ru

К настоящему времени различные типы клеток млекопитающих были репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) с помощью 4-х транскрипционных факторов: OCT4, KLF4, SOX2 и C-MYC. Некоторые первичные раковые клеточные линии человека были также репрограммированы в иПСК. В данной работе мы анализировали возможность к репрограммированию широко используемых и новой линии immortalized fibroblasts (иФБ) в иПСК. Кроме фундаментальных вопросов, данный подход получения иПСК от immortalized fibroblasts (иФБ) является важным для проведения различных генетических экспериментов. В свою очередь он позволяет генерировать клеточные линии мутированные с помощью CRISPR/CAS9 для дальнейшего анализа функции интересующего гена при репрограммировании и дифференциации. Мы исследовали общеизвестные клеточные линии NIH3T3 и STO и новую линию immortalized fibroblasts (иФБ) tKM, полученную с помощью overexpression cMyc и Klf4. Reprogramming проводили с помощью высокоэффективной лентивирусной полицистронной системы экспрессии OKSM, а также полицистронной конструкции OSKM или overexpression каждого фактора в отдельности. Reprogramming проводили стандартным способом с использованием feeder fibroblasts и среды N2B27 2i. Наши эксперименты показали, что в отличие от контрольных fibroblasts, хотя все клеточные линии проходили первую и вторую стадии, но не завершали репрограммирование в плюрипотентное состояние. Clones, полученные из immortalized fibroblasts не экспрессировали плюрипотентные маркеры - Nanog и SSEA1 и не поддерживались в культуре как иПСК. Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что анеуплоидия и нарушенные сигнальные пути immortalized fibroblasts делают их невосприимчивыми к репрограммированию в плюрипотентное состояние.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-50-00068 и 17-14-01407).

ВЛИЯНИЕ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК И ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ НА СИСТЕМУ КООГУЛЯЦИОННОГО ГЕМОСТАЗА КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Силачев Д.Н.*, Горюнов К.В., Шпилюк М.А., Плотников Е.Ю., Зубков В.В., Зоров Д.Б., Сухих Г.Т.

Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова, Москва, Россия;

**d_silachev@oparina4.ru*

Безопасность трансплантации ММСК неоднократно доказана во многих исследованиях. Однако имеются сообщения о единичных случаях осложнений с развитием тяжелой легочной тромбоэмболии или тромбозов. В ряде работ было показано, что ММСК могут экспрессировать на своей поверхности тканевой фактор свертывания крови (ТФ), являющийся одним из основных инициаторных звеньев коагуляции. Внеклеточные везикулы (ВВ), выделенные из ММСК, также могут нести на своей поверхности аналогичные рецепторы и белки. Цель данной работы: изучить влияние ММСК и ВВ на систему коагуляционного гемостаза человека и способы коррекции их прокоагуляционных эффектов.

ММСК получали из пуповины человека. ВВ выделяли из кондиционированной среды ММСК методом дифференциального центрифугирования. Произведена оценка основных параметров системы гемостаза методом тромбоэластометрии и тромбодинамики при добавлении ММСК или ВВ в человеческую кровь или плазму.

Добавление ММСК в количестве $50 \cdot 10^3$ клеток в 1 мл крови доноров приводит к снижению времени коагуляции (СТ) в 2 раза, а максимальная скорость образования сгустка (V_{max}) возрастает в среднем 2,5 раза, по сравнению с контролем. Помимо этого, было показано, что данный эффект является дозозависимым. Более того, добавление ММСК в кровь беременных женщин и новорожденных с различными патологиями еще более значительно снижало СТ. Добавление ВВ цельную кровь также вызывало увеличение СТ и V_{max} в несколько раз. Методом тромбодинамики было показано, что добавление ММСК и ВВ в плазму крови приводило к увеличению скорости образования сгустка в среднем в 1,5-2 раза и не влияло на плотность сгустка. Также, методом вестерн-блоттинга мы подтвердили наличие ТФ на поверхности ММСК и ВВ.

Таким образом, ММСК и ВВ несут на своей поверхности тканевой фактор, который может быть ответственным за прокоагулянтные свойства. Необходима разработка методов, направленных на предотвращение побочного влияния ММСК и ВВ на систему гемостаза крови. Работа поддержана грантом МД-2065.2018.4.

ПОЭТАПНОЕ СОЗРЕВАНИЕ И САМООРГАНИЗАЦИЯ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИОЦИТОВ

Слотвицкий М.М.^{1*}, Цвеляя В.А.¹, Фролова Ш.Р.¹, Валетдинова К.Р.², Дементьева Е.В.², Агладзе К.И.¹

1. *Московский физико-технический институт (Государственный университет),
Лаборатория биофизики возбудимых систем, Долгопрудный, Россия*
2. *Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия*
**slmxa@mail.ru*

Эффективное получение функциональной сердечной ткани из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСК) является основной задачей при создании как имплантов, так и тканевых тест-систем. Основным критерием функциональности является наличие развитых межклеточных контактов, обеспечивающих синхронное проведение волны возбуждения по всей ткани. Полное формирование кардиомиоцитов из ИПСК в процессе дифференцировки занимает около 60-90 дней, к этому моменту полученные клетки не способны образовывать между собой новые связи. Целью данной работы является исследование созревания индуцированных человеческих кардиомиоцитов. Задачами работы были изучение способности кардиомиоцитов, полученных из ИПСК, на ранних этапах дифференцировки образовывать между собой функциональные контакты, характеристика свойств проведения ткани, а также изучение сопутствующего образованию ткани процесса самоорганизации кардиомиоцитов. Репрограммирование в ИПСК выполнено в ИЦиГ СО РАН (г. Новосибирск). На различные дни дифференцировки клеточные связи разрушались трипсинизацией, полученная суспензия клеток высаживалась на новую подложку. В течение нескольких дней наблюдалось формирование электромеханического синцития. Для наблюдения распространения волн использовался метод оптического картирования с применением Ca^{2+} -зависимого красителя Fluo-4. Помимо этого, наличие клеточных контактов определялось по экспрессии *cx43*, определяемой методом иммуноцитохимии. Тем же методом изучалось распределение кардиомиоцитов в дифференцированной культуре. По результатам работы был определен этап дифференцировки, на котором кардиомиоциты имеют достаточно развитую электрофизиологию, но при этом еще способны образовывать между собой функциональные контакты и самоорганизоваться в однородную ткань.

LIPSI: ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ЖИВЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Смирнова Т.

Никон Россия

Компания Nikon представляет новую разработку – программно-аппаратный комплекс для высокопроизводительного скрининга живых и фиксированных клеточных культур, анализа изображений и представления данных. Система LIPSI разработана совместно с Prior Scientific и Life Imaging Services и построена на базе инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti2-E - флагмана линейки инвертированных микроскопов Nikon.

Робот плавно переносит планшет из зоны культивирования, где размещается до 20 планшетов стандарта SBS, на моторизованный предметный столик микроскопа и обратно. Планшеты затемнены и размещены в условиях непрерывного поддержания температуры, влажности и уровня CO₂. Конфигурация инкубатора оставляет полный доступ к левому боковому порту микроскопа и опционально к двум дополнительным портам, что обеспечивает беспрецедентную для высокопроизводительных систем гибкость конфигурации: LIPSI совместима как с фотокамерами, так и с конфокальными системами на основе диска Нипкова или с лазерной сканирующей системой Nikon A1R, с широким полем зрения до 25мм. LIPSI сохраняет доступ к заднему порту микроскопа и позволяет использовать одновременно или поочередно несколько систем освещения благодаря модульной системе Nikon Ti2-LAPP. Таким образом, LIPSI предназначена для высокопроизводительного скрининга: съемка 384-луночного планшета, 1 кадр на лунку, занимает менее 5 минут; съемка 96-луночного в 4 каналах флуоресценции может занимать менее 2 минут. Вместе с этим LIPSI может быть сконфигурирована также для задач микроскопии высокого разрешения, где роботизированная подача образца не требуется: с иммерсионными объективами, TIRF, и даже системой суперразрешения Nikon N-STORM.

Концепция систем Nikon для микроскопии – объединённая программная платформа для всех методов получения изображений. Разработка гибко конфигурируемой LIPSI стала возможной благодаря многолетнему опыту в интеграции управляемых аппаратных компонентов в программе NIS Elements. LIPSI работает под управлением NIS Elements; в едином программном обеспечении проводится настройка режимов получения многомерных кубов данных, экспорт захваченных изображений во внешнюю базу данных с сохранением аннотаций, импорт данных с гибкими настройками отображения и повторного использования преднастроек, а также создание отчётов, куда наряду с

фотографиями могут включаться и результаты количественного анализа изображений в виде статистических данных и графиков. Модуль NIS Elements JOBS позволяет создать шаблон для очень сложных режимов съемки и анализа, а при использовании шаблона предоставить пользователю доступ лишь к тем настройкам, которые могут требовать изменений. Автоматический анализ изображений может проводиться в ходе автоматизированной съемки для определения объектов интереса, с последующей более детальной съемкой объектов интереса, без выхода из автоматического режима.

Система LIPSI будет позиционироваться как моторизованный микроскоп или конфокальная система с возможностью высокопроизводительной съемки для университетов и центров коллективного пользования, а также как высокопроизводительная платформа для доклинических исследований на живых клеточных культурах.

ПЛЮРИПОТЕНТНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ: ОТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ВОПРОСОВ К КЛИНИКЕ

Томилин А.Н.

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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). В докладе будет освещена история развития данного направления биологии, включающая собственные исследования, 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.

СИСТЕМНЫЕ И МЕСТНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ НА ТЕРАПИЮ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ У БОЛЬНЫХ С ВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ КИШЕЧНИКА

Трубицына И. *, Князева О., Парфенов А., Смирнова А., Варванина Г., Ручкина И.

*Центральный научно-исследовательский институт гастроэнтерологии в составе
МКНЦ имени А.С. Логинова, Москва, Россия*

**ie.trubitsyna@gmail.com*

Изучение стволовых клеток (СК) привело к появлению нового направления в медицине, получившего название "регенеративная медицина".

Цель - установить особенности системного и местного иммунного ответа на введение СК.

Материал и методы - 102 пациента ВЗК. Цитокины в сыворотке крови и экстрактах слизистой определяли иммуноферментным методом. Статистическую обработку полученных результатов проводили методом Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Сроки наблюдения через 2, 4 и 8 мес - в первой группе больных (44). Вторая группа (группа сравнения) - 30 больных с синдромом раздраженного кишечника (СРК), получавших стандартную терапию. При ВЗК в сыворотке крови до введения СК и спустя 2, 4 и 8 мес., соответственно, наблюдалось снижение иммуноглобулинов: IgM 1,6 - 2,18 - 2,34 г/л; IgG - 11,2 - 14,6 - 14,8 г/л; IgA - 1,42 - 2,84 - 2,88 г/л (в контроле - 1,6 - 11,3 - 2,3 г/л, соответственно). Особенно уменьшаются концентрации подклассов IgG в основном IgG 1, 2, 4. Низкое содержание циркулирующих иммуноглобулинов обусловлено длительной терапией иммуносупрессантами (глюкокортикоидами, цитостатиками), введение СК предупреждает повышение концентрации иммуноглобулинов, прежде всего IgA ($P < 0,05$), опосредующее местный гуморальный иммунный ответ. Введение СК при ВЗК приводило к достоверному снижению антителами к нейтрофилам с 42 до 28 ед/мл через 2 мес. у пациентов с ВЗК; в динамике через 4 и 8 мес. отмечено снижение с 26 до 18 ед/мл, соответственно (0,05). В сыворотке крови увеличивается концентрация противовоспалительных цитокинов на 50-70 %. В слизистой оболочке содержание провоспалительных цитокинов снижается на 50 %.

Заключение. Трансплантация подавляет иммунное воспаление, устраняя дисбаланс в системе Th1/Th2. В результате регуляторного воздействия при ВЗК активируются процессы регенерации, способствующие заживлению язвенных поражений слизистой оболочки кишечника.

АПОПТОЗ – РОЛЬ ПРОТИВОПОЛОЖНОГО ЭФФЕКТА В РЕГЕНЕРАЦИИ МИОКАРДА

Тюкавин А.И.^{1*}, Белостоцкая Г.Б.², Захаров Е.А.¹

1. Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Россия

2. Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*atuukavin@mail.ru

Одним из наиболее перспективных ресурсов организма для восстановления целостности миокарда после ишемического повреждения и оптимизации функций сердечной мышцы в процессе старения являются резидентные кардиальные стволовые клетки, а также мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (КСК, МСККМ). Механизмы их взаимодействия в целостном организме остаются неясными. Известно, что апоптоз (в отличие от некроза), одновременно с удалением необратимо поврежденных клеток, инициирует процессы, которые стимулируют пролиферацию клеток, находящихся на ранних стадиях дифференцировки. Представляется, что апоптозные тела клеток, в том числе кардиомиоцитов, являются важным элементом системы обратной связи между интенсивностью гибели клеток и скоростью регенерации миокарда за счет стволовых клеток сердца.

Представлены аргументы в пользу гипотезы, согласно которой АпТ клеток сопрягают функции КСК и МСККМ в зонах регенерации миокарда. На поверхности АпТ расположены сигнальные молекулы, которые опосредуют хоуминг и хемотаксис МСККМ в зону поврежденного миокарда. МСККМ обеспечивает целевую доставку факторов роста и цитокинов, необходимых для поддержания пролиферации КСК. Внутри апоптозных тел (АпТ) локализован комплекс молекул, носителей “эпигеномной памяти” о тканевой принадлежности клетки, погибшей запрограммировано. Вероятно, что одновременно с запуском эффекторного звена апоптоза, завершающегося образованием АпТ, происходит экспрессия микроРНК, профиль которых и является “кодом” тканевой принадлежности погибшей клетки. При проникновении АпТ эндоцитозом в КСК специфический набор микроРНК вызывает экспрессию генов, определяющих направленность дифференцировки резидентных стволовых клеток миокарда. МСККМ через паракринные эффекты факторов роста поддерживают пролиферацию коммитированных клеток. Можно полагать, что эта гипотеза справедлива не только в отношении сердца, но и других органов и тканей.

Идентификация эффекторов регенерации в АпТ открывает перспективу получения природоподобных фармакологических агентов, повышающих сократимость миокарда после ишемических повреждений сердечной мышцы и при старении за счет активации резидентных стволовых клеток сердца и привлечения из кровотока в миокард мезенхимных клеток косного мозга.

КЛИНИЧЕСКИЙ ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ МОНОНУКЛЕАРОВ ПУПОВИННОЙ КРОВИ САМАРСКОГО ЦЕНТРА КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

Тюмина О.В.^{1,2}, Волчков С.Е.², Овчинников П.А.²

1. *ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия*
2. *ГБУЗ Самарский областной медицинский центр «Династия», Самара, Россия
centr123@bk.ru*

Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток - первый метод применения стволовых клеток с доказанной эффективностью для лечения гематологических, онкологических и наследственных заболеваний.

Материал и методы. Результаты клинического применения мононуклеаров пуповинной крови (ПК) из Самарского центра клеточных технологий с 2003-2017 гг.

Методы: статистический, системного анализа, социологический.

Результаты. За 15 лет в РФ создано криохранилище уникального биоматериала – стволовых клеток ПК в 14 банках ПК, по данным на 2016 г. в них - 55 576 образцов ПК персонального хранения (из них Самарских – 2500). Кроме того, в РФ 3 банка ПК занимается хранением донорских (публичных) образцов ПК, в них насчитывается - 13 240 образцов ПК (из них Самарских – 8400).

Самарский банк ПК – единственный в РФ, интегрированный в Международный регистр доноров костного мозга и банков ПК BMDW (с 2012 г.). За все время работы было передано для трансплантации 63 образца ПК. Из них 31 - в российские трансплантационные центры и 32 - в зарубежные. Оценка результатов трансплантации проведена по полученным отчётам (25 пациентов). Подбор образцов ПК осуществлялся по результатам HLA. Каждый образец ПК содержал не менее 150×10^7 ядродержащих клеток, количество жизнеспособных CD34+ -клеток не менее $1,6 \times 10^6$, все образцы имели отрицательные результаты на гемотрансмиссивные инфекции.

Наиболее частые патологии для трансплантации: острый лимфобластный лейкоз и острый миелобластный лейкоз. Средний возраст пациентов - 15 ± 9 лет. Общая выживаемость после трансплантаций ПК составила 72%, общая безрецидивная выживаемость - 56% (медиана наблюдения 365 дней).

Кроме того, из Самарского банка ПК за последние 5 лет увеличилась активация образцов ПК и мезенхимальных стволовых клеток для применения в других направлениях медицины: стоматологии – 15 пациентов, хирургии (циррозы, атеросклероз сосудов НК) – 51, неврологии (ДЦП, последствие инсультов) – 105 пациентов.

Выводы. Востребованность образцов ПК для клинического применения возрастает и в ближайшем будущем должна увеличиться в 4 раза (с 2% до 12%).

ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ БОЛЬНЫХ ДИФFUЗНОЙ В-КРУПНОКЛЕТОЧНОЙ ЛИМФОМОЙ БЕЗ ПОРАЖЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА

Фастова Е.А*, Магомедова А.У., Петинати Н.А., Сац Н.В., Дризе Н.И., Капранов Н.М., Давыдова Ю.О., Кравченко С.К., Савченко В.Г.

ФГБУ НМИЦ гематологии Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*fastova12@gmail.com

Введение. Показано, что у больных лейкозами изменено стромальное микроокружение костного мозга (КМ) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК). У большинства больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) не диагностируется поражение КМ. Предполагалось, что свойства МСК у больных ДВККЛ без поражения КМ не изменены. Целью исследования было изучение МСК у больных ДВККЛ без поражения КМ в дебюте заболевания и через месяц после проведения терапии для определения влияния терапии на стромальные клетки предшественницы.

Методы. МСК 20 пациентов ДВККЛ в возрасте 42-60 лет (медиана возраста 53 года) в дебюте заболевания и через месяц после окончания лечения получали стандартным способом из 3-5 мл КМ. Анализировали суммарную клеточную продукцию МСК, относительный уровень экспрессии генов (ОУЭ) в МСК методом ПЦР в реальном времени и средний уровень флуоресценции (СУФ) методом проточной цитометрии. В контрольную группу включен 31 донор соответствующего возраста.

Результаты Оказалось, что суммарная клеточная продукция МСК у первичных больных была достоверно выше, чем у доноров ($11,4 \pm 2$ против $6,9 \pm 1,1$, $p=0,04$) и остается повышенной ($10,2 \pm 1,5$) после окончания терапии. Анализ СУФ некоторых антигенов выявил значительные отличия в МСК больных. В дебюте заболевания CD54 (ICAM1) повышен в 1,5 раза по сравнению с донорами. После лечения он возрастает в 6,3 раза, (456 ± 124 против 72 ± 16 , $p < 0,05$). После лечения также повышается экспрессия другой молекулы адгезии - CD146 (МСАМ) в 3,4 раза (1007 ± 245 против 291 ± 69 , $p < 0,05$). Экспрессия CD73 и CD105 имеет тенденцию к повышению в дебюте заболевания. CD73 увеличивается после лечения в 1,6 раза (1433 ± 433 против 632 ± 57 , $p < 0,05$), а CD105 в 4 раза (4578 ± 1159 против 610 ± 139 , $p < 0,05$) по сравнению с донорами.

В МСК больных ДВККЛ в дебюте заболевания и после лечения достоверно снижается примерно в 2 раза ОУЭ ICAM1 и MMP2, что указывает на

изменение способности МСК регулировать кроветворение. После лечения повышается ОУЭ *IL6* и *FGFR2*.

Свойства МСК – компонентов ниши в регулирующем кроветворение стромальном микроокружении, у больных ДВККЛ изменены, что может быть связано с секрецией опухолевыми клетками различных молекул, влияющих на МСК. Опухолевые клетки вызывают системное поражение кроветворения.

Работа поддержана грантом РФФИ 17-00-00170.

**ЦЕНТР СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК iVFRiga – НАЦИОНАЛЬНЫЙ БАНК СТВОЛОВЫХ
КЛЕТОК ЛАТВИИ. ИННОВАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В ЛАТВИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ**

Фодина В.В.

Центр стволовых клеток iVFRiga, Рига, Латвия
Violeta.fodina@ivfriga.eu

Центр стволовых клеток iVFRiga – первый и единственный банк стволовых клеток в Латвии. Банк стволовых клеток получил лицензию на фармацевтическую деятельность. Данная лицензия подтверждает, что лаборатории соответствуют требованиям и стандартам качества согласно директиве ЕС 2001/83/ЕС, No 1394/2007, также Центр стволовых клеток имеет право выделять стволовые клетки, культивировать их в условиях *in vitro*, замораживать и хранить для последующего приготовления лекарственных средств в соответствии с Регуллой Европейского Парламента и Совета № 1394/2007 об АТМР (advanced therapy medicinal product).

В докладе будет дан обзор процедуры по лицензированию GMP помещений для производства клеточных продуктов в Европе. Необходимые этапы для получения лицензии, требования к контролю качества АТМР будут проиллюстрированы на примере работы в iVFRiga. В докладе будет описано современное состояние клеточных технологий в Латвии и разработка АТМР в рамках hospital exemption.

МОРФОЛОГИЯ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ТОЛСТОЙ КИШКИ У БОЛЬНЫХ С ЯЗВЕННЫМ КОЛИТОМ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Г.В. Федотовских*, Г.М. Шаймарданова, А.Б. Оразбаева, М.С.Жумабаева

АО «Национальный научный медицинский центр», Астана, Казахстан

**gvf_fedotovskikh@mail.ru*

Согласно полученным нами клиническим данным степень активности язвенного колита после трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК) по индексу Мейо несколько снижалась с 7 до 5-6 баллов, оставаясь умеренной по классификации Truelove и Witts. В цель морфологического исследования входило изучить на светооптическом и электронномикроскопическом уровне 80 биоптатов слизистой оболочки толстой кишки (СОТК) у больных с язвенным колитом до и 22 биоптата после трансплантации МСК.

По классификации по К. Geboes и соавт. (2000) выраженная и умеренная степень воспалительной лимфоплазмоцитарной реакции уменьшалась до умеренной и слабой с 2-3 до 1-2 баллов, плотность воспалительного инфильтрата с 2-3 до 1 балла, уплощение покровного эпителия с 2 до 1 балла, расширение и повреждение крипт с 1-2 до 0-1 балла. Изменялись незначительно эрозивно-язвенные дефекты СОТК (2-3 балла). Однако, в покровном эпителии значительно увеличивалось количество бокаловидных клеток. Отмечено новообразование мелких капилляров и снижение степени фиброзирование подлежащей соединительной ткани, что электронномикроскопически подтверждалось фиброклазией коллагеновых фибрилл. В собственной пластинке СОТК увеличивалось количество макрофагов. Отмечены тесные межклеточные связи макрофагов с лимфоцитами и плазмоцитами. В пролиферирующем шеечном эпителии крипт и покровном эпителии появлялись значительные включения гликогена. Восстанавливалась ультраструктура межклеточных связей и микроворсинок апикальной поверхности цилиндрических клеток.

Таким образом, несмотря на небольшой клинический эффект и сохранение дефектов СОТК однократная трансплантация культивированных МСК больным с язвенным колитом положительно влияла на восстановление структуры бокаловидных и цилиндрических клеток покровного эпителия. Увеличение числа макрофагов свидетельствовало о сложных механизмах вовлечения МСК в регуляторные реакции местной иммунной системы.

ГРУППА КОМПАНИЙ «БИОЛАЙН»

Авторизованный представитель
ведущих производителей
оборудования и реагентов
для биомедицинских исследований:



- **BD Biosciences**

Многопараметровые проточные цитофлуориметры и сортировщики клеток, реагенты для проточной цитометрии



- **Leica Biosystems**

Микроскопы, оборудование и реагенты для гистологических исследований и иммуногистохимии

- **Leica Microsystems**

Системы для конфокальной микроскопии



- **PerkinElmer**

Приборы для клеточного имиджинга, системы для визуализации ин vivo, системы для многопараметрового анализа гистологических препаратов.



- **Biotek Instruments**

Многофункциональные планшетные ридеры и диспенсеры



Официальный дистрибьютор **BD Biosciences, Leica, PerkinElmer, Biotek** в России — компания «БиоЛайн»



ООО «БиоЛайн»
Россия, 197101,
Санкт-Петербург
Пинский пер., д. 3, Лит. А
тел.: +7 (812) 320 49 49
факс: +7 (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: +7 (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: +7 (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: +7 (343) 287 32 49
Владивосток, тел.: +7 (423) 201 18 08
Нижний Новгород, тел.: +7 (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: +7 (863) 268 99 32
Казань, тел.: +7 (843) 570 66 88
Самара: +7 (846) 246-06-54

Единый бесплатный номер сервисной службы для всех регионов России: 8 800 333 00 49

Nikon Instruments — мировой лидер в разработке и производстве оптических и цифровых технологий для биомедицинских приложений. Мы поставляем оптические системы «под ключ» - отточенные до мелочей, мощные и производительные. Наши главные продукты — микроскопы и стереомикроскопы, камеры и программное обеспечение. Сервис и поддержка от производителя на территории России

Ti2 – микроскоп для прижизненной визуализации

ПО NIS Elements, управляемые компоненты микроскопа Никон, внешние диодные осветители, камеры Никон и топовые камеры других брендов дают возможность сверхбыстрой совместной работы для высокоскоростной автоматизированной съемки, когда требуется быстро и воспроизводимо переключаться между разными позициями, разными каналами флуоресценции и даже методами наблюдения

Система LIPSI на базе Ti2-E и ПО NIS Elements

Создана для высокопроизводительного скрининга живых клеток. Роботизированная подача до 20 многолуночных планшетов, не покидая объема с контролем условий инкубации. Быстрая многоканальная съемка, автоматический анализ изображений и представление данных. Совместима с различными фотокамерами, конфокальными системами, объективами.



Ti2-E – идеальный микроскоп для Вашей конфокальной системы

На базе одного микроскопа Ti2-E могут комбинироваться конфокальные системы с системами суперразрешения N-SIM и N-STORM в различных сочетаниях — теперь с возможностью автоматической смены метода визуализации в процессе автоматизированной съемки



Официальный дистрибьютор ООО «БМТ»

117342, г. Москва, ул. Бутлерова, 175 108

+7 (495) 504 15 52, info@bmtltd.ru, www.bmtltd.ru



www.nikoninstruments.com

С характеристиками и примерами использования нашей продукции вы можете более полно ознакомиться на нашем сайте или задав вопрос специалистам:
+7 495 663 77 64 microscopy@nikon.ru

C2+ с детектором DUVB на основе GaAsP PMT: бескомпромиссное качество изображения. Чтобы снизить стоимость, мы снизили характеристики, влияющие на производительность — но не на качество

A1R HD 25 – конфокальный микроскоп с резонансным сканером 1024x1024 пикселей, с возможностью одновременной съемки до 4 каналов флуоресценции с частотой до 15 кадров/с при полном разрешении. Широчайшее поле зрения 25 мм

A1R MP+ — система для получения мультифотонных изображений, объединенная с конфокальным микроскопом

Сверхбыстрая визуализация с высоким разрешением. Высокая яркость при съемке даже на большой глубине с лазером до 1300 нм. Возможно использование двух инфракрасных лазеров, возбуждение видимыми лазерами

CFI Aplanachromat 25xW MP 1300 — новый объектив с апертурой 1,1 и рабочим расстоянием 2,0 мм для съемки на большой глубине, с превосходным пропусканием в широчайшем диапазоне длин волн

СОБСТВЕННЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК ФАКТОР АНТИСТАРЕНИЯ

Халявкин А.В.^{1, 2*}

1. Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Москва, Россия.

2. Институт системного анализа ФИЦ ИУ РАН, Москва, Россия.

**antisenesco@mail.ru*

Стволовые клетки являются одним из основных средств медицины антистарения и регенеративной медицины. Тканевые стволовые клетки взрослого организма до конца жизни могут реализовать свои потенции в процессе физиологического обновления тканей и при их репаративной регенерации. То, что эти потенции заметно угасают с возрастом, привело некоторых исследователей к заключению о первичности старения стволовых клеток по отношению к старению организма. Поэтому возникла гипотеза о ведущей роли первичного старения стволовых клеток в возрастном замедлении обновления тканей и неполноте этого процесса. С другой стороны, выяснилось, что стволовые клетки пожилых людей в подходящих условиях способны практически полностью восстанавливать свой потенциал и что у них отсутствует лимит Хейфлика. Из этих и других данных следует, что истинное старение клеток, скорее всего, вторично и связано с их жизнедеятельностью в условиях стареющего организма или неадекватного микроокружения в культуре. И такое старение оказывается частично обратимым. Но активность всех клеток, в том числе и стволовых, подчиняется центральному механизму управления организмом. А он у стареющей особи находится вне зоны динамической устойчивости. Это приводит к неадекватному уменьшению активности стволовых клеток, замедлению самообновления тканей и цитопении. В результате снижается надежность организмов, повышается заболеваемость и смертность с возрастом. Но старение самих стволовых клеток оказалось обратимым и *in vitro* и *in vivo*.

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ВЕЩЕСТВ НА ИНДУЦИРОВАННЫХ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ КАРДИОМИЦИТАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ ИПСК

Цвелея В.А.*, Слотвицкий М.М., Фролова Ш.Р., Агладзе К.И.

*Московский физико-технический институт (государственный университет),
Лаборатория биофизики возбудимых систем, Долгопрудный, Россия
vts93@ya.ru

На данный момент появляются всё новые, основанные на ИПСК, системы для изучения патологий и влияния внешних факторов на клетки человека. Такие системы разрабатываются для изучения сердечно-сосудистых заболеваний. Многие факторы меняют нормальную проводимость возбуждения в сердце на хаотический режим: неправильное функционирование мембранных каналов, локальная ишемия, воздействие лекарственных средств и др. Выявление лекарств, влияющих на проводимость сердца, и пациентов, находящихся в группе риска внезапной сердечной смерти, остается нерешенной проблемой современной медицины. Для ее решения необходим комплексный тест на аритмогенность сердечной ткани, который бы показывал численное значение риска возникновения аритмий во взаимосвязи с различными факторами, что и является целью данной работы.

В этой работе был использован факт формирования реентри в слое сердечных клеток как показатель аритмогенности и то, что увеличение частоты стимуляции в сердечной ткани часто приводит к разрыву волн и последующему образованию реентри. Пациент-специфичная линия ИПСК была дифференцирована в монослой, который был идентифицирован с помощью иммуоцитохимии и метода патч-кламп. Чтобы изучить возникновение реентри (предшественника аритмий), в слое выращенных клеток было создано стандартное острое препятствие, чтобы не учитывать стохастические неоднородности. С помощью оптического картирования определялась мера аритмогенности, которая представляет собой вероятность возникновения реентри для конкретной частоты стимуляции культуры ткани, состоящей из индуцированных кардиомиоцитов человека.

По данным работы была показана аритмогенность ткани, имитирующей LQTS, которая возрастала. Данный метод может также использоваться в качестве характеристики аритмогенности для других препаратов, таких как: лидокаин, новокаин и др. Таким образом, используя предложенный метод, основанный на пациент-специфичных ИПСК, возможно изучение и количественное определение аритмогенности данной сердечной ткани.

EXCITATION WAVE PROPAGATION IN SELF-ORGANIZED MONOLAYERS OF HUMAN CARDIOMYOCYTES FROM PATIENT WITH LONG QT-INTERVAL

Tselaya V.A.^{1*}, Frolova S.R.¹, Dementieva E.V.², Zakian S.M. ², Agladze K.I.¹

1. *Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

2. *The Federal research center institute of cytology and genetics, Novosibirsk, Russia*

*vts93@ya.ru

Prolonged QT-interval is one of the main reasons to assign a person to the risk group of cardiovascular disease. Elongation of the QT-interval may be caused by several acquired pathologies or specific mutations. In our work, we used human induced pluripotent cells of two lines: if-31, which are reprogrammed cells from a patient with the prolonged QT-interval, as well as a control line isma6L, derived from the healthy patient. For getting iPSC lines, in the fibroblasts of patients with the syndrome of prolonged QT- interval and an elongated spinal muscular atrophy episomal vector expressing genes OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC via nucleofection was delivered. These genes are responsible for maintaining the pluripotent state. For differentiation to the cardio cells GiWi protocol was used, the duration of which takes 12 days. However, for the mature cardiomyocytes in a number of protocols cells were kept in the post-differentiation conditions up to six months.

After differentiation (day 11-12) cell monolayer formed visually and about 30-50% of the layer surface contracted. Using flow cytometry, we counted the number of cells, which are positive for sarcomeric alpha-actinin. For if31-5 line (on day 16) it was 15.3%, for iSMA6L line (on day 20) - 14.6%. Also, on day 15 optical mapping of the differentiated cell monolayers were conducted. An excitation wave propagated over the entire surface of the monolayer, which allowed measuring critical stimulation frequencies for the tissue culture. The monolayers were removed and seeded as single cells to check for Patch Clamp. However, on a day 16 from starting differentiation procedure cells showed only potassium currents.

As the number of cells, which are positive for sarcomeric alpha-actinin for both cell lines were about 15%, it shows the stability of differentiation. In addition, it indicates the role of these cells in monolayer surface contractility function. Interestingly, in contradistinction to other differentiation protocols, electro-mechanical syncytium formed already on the 15th day after differentiation. Considering patch-clamp results, it could show the main role of potassium channels to form the excitable tissue itself.

АДГЕЗИЯ И ПРОЛИФЕРАЦИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НА ПОЛИКАПРОЛАКТОНОВЫХ МАТРИЦАХ, МОДИФИЦИРОВАННЫХ АРГИНИНОМ

Чабина А.С.^{1,2*}, Нашекина Ю.А.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого (СПбПУ), Санкт-Петербург, Россия

**chabina-alina@yandex.ru*

Биодеградируемые полимеры широко применяют в современной медицине. Одним из таких полимеров является поликапролактон (ПКЛ), однако его биологическая совместимость не удовлетворяет требованиям имплантации в организм, так как клетки плохо адгезируют на данный материал. Поэтому требуется модификация, которая позволит улучшить биосовместимость полимера. Одной из возможных модификаций является обработка матриц природной аминокислотой - аргинином, проверить эффективность которой и является задачей этого исследования.

В настоящей работе поликапролактоновые матрицы модифицировали аргинином. Матрицы получали методом полива из раствора ПКЛ в хлороформе, затем обрабатывали в 0,5 М, 0,25 М, 0,1 М водном растворе аргинина и в 0,25 М, 0,1 М водно-спиртовом растворе аргинина (соотношение воды к спирту (ИПС) 3:1), в течение 10, 30 и 60 минут при T=40°C и при комнатной температуре в течении суток, а после промывали в дистиллированной воде 10 минут. После модификаций была проведена проверка влияния обработки аргинином на адгезивность и жизнеспособность клеток, культивируемых на поликапролактоновых матрицах. Показано, что наличие этой модификации улучшает данные показатели для мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Было выявлено, что с увеличением количества аргинина на матрицах, количество осевших клеток тоже увеличивается. А после обработки 0,5 М водным раствором аргинина при комнатной температуре количество клеток на матрице было близко к количеству клеток в контрольном образце (культуральный пластик).

Количество сайтов связывания клеток с поверхностью оценивалось с помощью окраски на винкулин. Было выявлено, что оно прямо пропорционально содержанию аргинина на матрице, но наибольшее их количество заметно после обработке матриц раствором аргинина при T=40°C.

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

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Чубарь А.В.^{1,3}, Семенова Н.Ю.², Ругаль В.И.², Грицаев С.В.², Бессмельцев С.С.², Котова А.В.^{1,3,4}, Золина Т.Л.³, Сувильникова О.В.^{3,4}, Енукашвили Н.И.^{1*}

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 2. ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия
 3. ООО «Покровский Банк стволовых клеток», Санкт-Петербург, Россия
 4. ФГБОУ СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия
- *nie@newmail.ru

Множественная миелома (ММ) – злокачественное гематологическое заболевание, характеризующееся перерождением плазматических клеток в костном мозге (КМ). Важную роль в развитии ММ играет взаимодействие опухолевых клеток и микроокружения, представленного клетками эндотелия, иммунными клетками, мезенхимными стромальными клетками (МСК), остеоцитами и другими. Миеломные клетки контролируют активность микроокружения, выделяющего факторы для поддержания роста опухоли. Одним из наиболее эффективных методов лечения ММ является аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (аутоТГСК).

Цель работы: сравнить характеристики МСК КМ пациентов с первично диагностированной ММ до и после аутоТГСК.

МСК выделяли из материала стерильной пункции пациентов с ММ (до или после лечения). Определяли пролиферативную активность клеток, уровень секретируемых цитокинов, способность к остеогенной дифференцировке, наличие гладко-мышечного актина, активной β -галактозидазы, транскриптов прицентромерного сателлита хромосомы 1 и ретропозона HERV-H. Для оценки влияния клеток миеломы на эти свойства МСК проводили бесконтактное сокультивирование с клетками линии RPMI-8226.

Для МСК КМ пациентов до лечения показано появление признаков опухоль-ассоциированных фибробластов: снижение скорости пролиферации, синтез провоспалительных цитокинов, появление признаков клеточного старения, в т.ч. экспрессия тандемно повторяющейся сателлитной ДНК, но не ретропозона HERV-H, который экспрессировался только в клетках опухоли. После лечения только у части пациентов наблюдалось восстановление этих параметров до значений, полученных для здоровых доноров. Таким образом МСК с

опухоль-ассоциированным фенотипом у некоторых пациентов сохраняются после лечения. Мы полагаем, что на исход лечения и вероятность рецидива может влиять активность не только опухолевых клеток, но и изменённое микроокружение, устойчивое к терапевтическому воздействию.

Работа поддержана Грантом Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых №МК-6706.2018.7., Российским научным фондом (грант 15-15-20026).

ПОТОМКИ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПЕРЕЖИВШИХ СУБЛЕТАЛЬНЫЙ ТЕПЛОВОЙ СТРЕСС

Шилина М.А.*, Гринчук Т.М., Алексеенко Л.Л., Анацкая О.В., Виноградов А.Е.,
Никольский Н.Н.

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

**shili-mariya@yandex.ru*

Применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) в регенеративной медицине с каждым годом получает все большее развитие. Использование МСК в терапевтических целях предполагает наличие их генетической стабильности, в частности стабильного кариотипа. Как перед трансплантацией, так и в ее процессе, трансплантируемые СК подвергаются воздействию различных стрессовых факторов, что может вызвать дестабилизацию кариотипа. Целью настоящей работы было изучить генетическую стабильность потомков эндометриальных мезенхимных стволовых клеток человека, переживших сублетальный тепловой шок. Для изучения последствий влияния теплового шока на генетический аппарат клетки в настоящей работе был проведен анализ потомков эМСК, переживших сублетальное тепловое воздействие, с использованием G-бэндинга метафазных хромосом, молекулярного кариотипирования и транскриптомного анализа. Анализ структуры кариотипа выявил вспышку кариотипической нестабильности, которая была связана с анеуплоидизацией клеток и наличием хромосомных поломок. Возникшая дестабилизация носила случайный характер. Молекулярное кариотипирование подтвердило случайный характер возникших изменений. Биоинформационный анализ данных секвенирования мРНК выявил трансгенерационный дефицит гомологичной рекомбинации и чекпоинта повреждения ДНК, чем объясняется возникшая кариотипическая нестабильность. Использование транскриптомного анализа показало, что обнаруженная хромосомная нестабильность не имеет онкогенного потенциала, т.к. была выявлена низкая экспрессия онкогенов mTOR, MDM2, KRAS и EGFR, поддерживаемая плотной ко-регуляцией между термочувствительными драйверами гомологичной рекомбинации (которые уменьшали экспрессию после обработки сублетальным ТШ). Вход этих клеток в фазу репликативного старения подтверждает отсутствие в них иммортализации и онкогенной трансформации.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00068.

МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ: ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМИ ЛЕЙКОЗАМИ

Шипунова И.Н.*, Петинати Н.А., Дризе Н.И., Кузьмина Л.А., Паровичникова Е.Н., Савченко В.Г.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» МЗ РФ, Москва, Россия

*iranifontova@yandex.ru

Введение. Мезенхимные стволовые клетки и их потомки формируют стромальное микроокружение костного мозга (СМ), регулирующее кроветворение. Острые лейкозы имеют клональное происхождение; лейкозные стволовые клетки (ЛСК) имеют много общих свойств со стволовыми кроветворными клетками (СКК), но несут специфичные для разных нозологий генетические изменения. Целью работы было выявить изменения в СМ, поддерживающем ЛСК, на модели мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК).

Методы. Проанализировали ММСК больных острым миелоидным (ОМЛ, N=32) и острым лимфобластным (ОЛЛ, N=20) лейкозами. ММСК получали стандартным методом из костного мозга больных при проведении диагностических аспираций после информированного согласия. Экспрессию генов изучали с помощью ПЦР в реальном времени.

Результаты. В дебюте заболевания в ММСК больных острыми лейкозами выявлены общие тенденции в изменении экспрессии генов. Повышена экспрессия генов, регулирующих: СКК и кроветворные клетки-предшественницы (*JAG1*, *LIF*, *IL6*, *CSF1*); адгезию кроветворных клеток (*VCAM*). При этом экспрессия гена *ICAM1* у больных ОЛЛ снижена, а в случае ОМЛ – повышена. Также изменена экспрессия генов, регулирующих ММСК: их пролиферацию (снижена экспрессия генов сигнального пути *FGF2* (*FGF2*, *FGFR1* и *FGFR2*), но повышена – сигнального пути *PDGF* (*PDGFRA* и *PDGFRB*)); дифференцировку (повышена экспрессия генов, отвечающих за жировую дифференцировку, но снижена – генов, регулирующих костную и хрящевую). Также в обеих нозологиях повышена экспрессия *IL1B* и его рецептора *IL1BR1*.

Через полгода от начала лечения экспрессия всех указанных генов снижается и становится ниже таковой у доноров, за исключением *LIF*, *IL6* и *IL1B*. У больных ОЛЛ, лечение которых принципиально отличается от ОМЛ непрерывностью и продолжительностью курсов, экспрессия *IL1B* повышается сильнее, а *LIF*, *IL6* – снижается не так выражено, как у больных ОМЛ.

Заключение. Опухолевые клетки при острых лейкозах адаптируют СМ к поддержанию собственных ЛСК. Важно, что при разных нозологиях наблюдаются одинаковые изменения в паттерне экспрессии генов в ММСК. Последующее лечение в разной степени изменяет экспрессию генов и другие свойства ММСК. Тем не менее, общий характер реакции стромальных предшественников не отличается при изученных патологиях кроветворения.

ИНТРАМИОКАРДИАЛЬНОЕ ВВЕДЕНИЕ ММСК, ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ ГЕНОМ VEGF-165 ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ КОРОНАРНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

Шуман Е.А.^{1,2*}, Коротков А.В.^{1,2}, Makeev O.G.^{1,2}

1. *ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России, Екатеринбург, Россия.*
 2. *ГАУЗ СО "Институт медицинских клеточных технологий", Екатеринбург, Россия.*
- * *evgenyshuman@gmail.com*

Несмотря на успехи фармакологии и хирургии, ишемическая болезнь по-прежнему остается главной причиной смертности. Это обусловлено генетически детерминированным отсутствием новообразования сосудов в ответ на гипоксию в тканях сердца. Целью исследования являлось поиск путей коррекции данных нарушений.

Эксперимент проведен на кроликах - самцах породы Шиншилла. С целью обеспечения неполной окклюзии передней нисходящей ветви коронарной артерии сердца, выполнялась перевязка ее проксимального сегмента на мандрене, сужающая просвет сосуда на 80%. Группе животных № 1 интрамиокардиально вводили физиологический раствор; группе животных № 2 – ММСК; группе животных №3 - ММСК, трансфицированных геном VEGF-165. Трансфекцию ММСК проводили плазмидой с геном VEGF165 (pWZL Blast VEGF165).

Уровень ангиогенеза оценивали на 30-е сутки после операции на срезах миокарда, окрашенных гематоксилин-эозином.

Однократное интрамиокардиальное введение ММСК приводит к увеличению общего количества капилляров, по сравнению с группой №1, на 5,40%, диаметра открытых капилляров на 4,55%, длины функционирующих капилляров на 11,07%, увеличению площади обменной поверхности капилляров на 15,06% ($p \leq 0,05$) и увеличению парциального давления кислорода на 16,66%.

Однократное интрамиокардиальное введение ММСК, трансфицированных геном VEGF-165 в условиях моделируемой ишемии, приводит к увеличению общего количества капилляров, по сравнению с группой №2, на 3,73%, диаметра открытых капилляров на 3,13 %, длины функционирующих капилляров на 21,88% ($p \leq 0,05$), увеличению площади обменной поверхности капилляров на 23,96% ($p \leq 0,05$) и увеличению парциального давления кислорода на 30,55% ($p \leq 0,05$). По отношению с показателями группы №1 все отличия группы №3 достоверны.

В группе введения ММСК, трансфицированных геном VEGF-165, имеет место морфологически подтвержденная активация ангиогенеза.

РЕКОНСТРУКЦИЯ УРЕТРЫ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДОВ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Юдинцева Н.М.^{1*}, Нащекина Ю.А.¹, Шевцов М.А.¹, Горелова А.А.², Виноградова Т.И.², Муравьев А.Н.²

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия
 2. ФГБУ Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия
- *yudintceva@mail.ru

Основным методом лечения патологий мочеиспускательного канала является хирургический, где в качестве заместительного материала используют различные ткани. В настоящее время буккальная пластика (использование слизистой оболочки рта) признана «золотым стандартом» при реконструкции стриктур уретры. Недостатками этого вида пластики являются осложнения в донорской зоне, дефицит тканей и увеличение времени операции в связи с необходимостью получения лоскута. Тканевая инженерия является дисциплиной, которая предложила множество различных материалов для заместительной уретропластики. Целью данного исследования является сравнение терапевтической эффективности тканеинженерной конструкции (ТИК), приготовленной на основе полимерного двухслойного скаффолда, засеянного аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК), с использованием аутологичного трансплантата слизистой оболочки рта для реконструкции уретры кроликов. Внутренний слой скаффолда, приготовленный на основе поли-L-молочной кислоты, засеяли МСК, а внешний (водонепроницаемый) слой, полученный из поли-ε-капролактона, защищал клетки от агрессивного воздействия мочи. Для того, чтобы *in vivo* проследить судьбу МСК, последние были помечены суперпарамагнитными наночастицами оксида железа. У кроликов породы «шиншилла» был реконструирован дефект дорзальной поверхности уретры с использованием ТИК (экспериментальная группа) и с использованием буккальной пластики (контрольная группа). В течение последующих 12 недель у животных обеих групп осложнений не обнаружено. Последующий гистологический анализ продемонстрировал биоинтеграцию ТИК с окружающими тканями уретры. В экспериментальной группе не наблюдали фиброза, а воспалительная реакция была ниже по сравнению с контрольной группой. МСК, помеченные наночастицами, были обнаружены в уротелии, а их солокализация с антителами против маркера уротелия цитокератином (АЕ1/АЕ3), указывает на возможность дифференцировки клеток в неоуротелий. Наши результаты свидетельствуют о возможности эффективного использования разработанной ТИК для уретропластики.

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

ДОКЛАДЫ ПОСТЕРНЫЕ

ИЗМЕНЕНИЕ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕЧЕНИ ЗРЕЛЫХ И СТАРЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА НА ФОНЕ ВВЕДЕНИЯ ММСК

Юсупова В.Ч.^{1*}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Гребнев Д.Ю.^{1,2}, Примакова Е.А.³

1. ФГБОУ ВО УГМУ Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия

2. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

3. РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ 9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь

*yusupova1@inbox.ru

Целью исследования было изучить изменения морфометрических показателей печени зрелых и старых лабораторных животных на фоне трансплантации ММСК в условиях токсического гепатита, вызванного четыреххлористым углеродом.

Эксперименты выполнены на 54 белых зрелых лабораторных мышцах-самцах возраста 7-8 месяцев, массой 25-30 г. и 54 старых мышцах-самцах возраста 16-17 месяцев, массой 30-35 г. Эксперименты по получению культуры ММСК выполнены из хориона плаценты 10 лабораторных животных мышей-самок возраста 3–4 месяца, массой 22-27 г, срок гестации 14 дней. Токсический гепатит вызывали путем внутрибрюшинного введения CCl_4 (четырёххлористый углерод) в дозе 50 мкг/кг. Трансплантация клеток осуществлялась в хвостовую вену через 1 час после введения четыреххлористого углерода однократно. В зависимости от возраста животные были разделены на 2 группы (старые и зрелые). В каждой группе была выделена опытная и контрольная подгруппы. Животным опытных подгрупп в хвостовую вену вводилась суспензия ММСК в дозе 4 млн. кл/кг, контрольным подгруппам вводили 0,9% раствор NaCl – 0,2 мл. Производилась оценка морфометрических показателей печени на 1, 3, 7 сутки после трансплантации клеток. Изучались следующие показатели: общее количество гепатоцитов на 1 мм², площадь гепатоцитов, площадь ядра гепатоцитов, ядерно-цитоплазматический индекс, митотический индекс, количество двухъядерных гепатоцитов на мм². Достоверность отличий в сравниваемых выборках проведено с применением непараметрического (рангового) метода Манна-Уитни. Статистическая обработка данных проведена с помощью программного пакета SPSS Statistics (версия 17,0).

Проведенные исследования свидетельствуют о способности зрелых и старых лабораторных животных отвечать на трансплантацию ММСК в условиях острого гепатита активацией клеточной и внеклеточной регенерации. При этом в ранние сроки старые лабораторные животные отвечают на введение ММСК лишь активацией внутриклеточной регенерации.

.. .

ПОСТЕ

ОСТЕОГЕННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ПРИ РОСТЕ НА ГРАНУЛАХ БИОСИТАЛЛА

Александрова С.А.^{1*}, Касьянова Е.С.², Копелев П.В.^{1,2}, Гайдаш А.А.¹, Михайлова Н.А.¹, Блинова М.И.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого», Санкт-Петербург, Россия

*alekssvet2205@gmail.com

Актуальность настоящей работы заключается в изучении остеоиндуктивных свойств композитного материала на основе биокерамики – биоситалла силикоалюмофосфатной группы «БиоситСр-Элкор».

Цель данной работы состояла в исследовании морфологических особенностей и остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) кролика при росте на биоситалле.

Материалы и методы. Гранулы «БиоситСр-Элкор» ("ЭЛКОР", Санкт-Петербург, РФ) размером 0,1-0,3 мм промывали полной ростовой средой и наносили на них раствор коллагена I типа (100 мкг/мл). На гранулы сажали ММСК КМ, добавляли остеогенную среду и культивировали *in vitro* в течение 11 сут. Щелочную фосфатазу (ЩФ) выявляли окрашиванием клеток реактивом BCIP/NBT (Sigma). Удельную активность ЩФ определяли с помощью набора Alkaline Phosphatase Diethanolamine Activity Kit (Sigma) и последующей спектрофотометрии на приборе ПЭ-5400УФ. Выявление остеокальцина проводили методом флуоресцентной микроскопии после окраски антителами. Морфологическое состояние клеток регистрировали в процессе прижизненного наблюдения с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100 и после фиксации – методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе с энергодисперсионным детектором EDAX.

Результаты. Было отмечено усиление окраски на ЩФ у клеток, которые располагались в лунках с гранулами биоситалла. Также в этих условиях отмечено усиление флуоресценции остеокальцина. Удельная активность ЩФ показывала высокие значения в клетках, индуцированных в остеогенном направлении, при росте на гранулах (сопоставимые с положительным контролем). СЭМ выявила пластинчатые структуры на поверхности клеток и матричные везикулы в цитоплазме и рядом с клетками, являющиеся показателем остеогенной дифференцировки.

Вывод. Выявлены остеоиндуктивные свойства биоситалла для ММСК КМ кролика.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 14-50-00068 «Стволовые клетки - основа клеточных технологий».

ФАКТОР IGFBP3 В ПАРАКРИННОЙ ИНДУКЦИИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ В КУЛЬТУРЕ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭНДОМЕТРИЯ ЧЕЛОВЕКА

Васильева И.О., Витте М.А., Кошеверова В.В., Каменцева Р.С., Шатрова А.Н.,
Бурова Е.Б.*

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*lenbur87@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия человека (эмСК) являются тканеспецифическими мультипотентными стволовыми клетками, которые находят всё более широкое применение в регенеративной медицине. В условиях сублетального окислительного стресса эмСК подвергаются преждевременному старению, в процессе которого они секретируют огромное количество различных факторов. Ранее мы установили, что компоненты секретома старых эмСК вовлечены в процесс распространения старения в культуре. Протеомный анализ состава секретома как старых, так и молодых эмСК был реализован посредством методов ВЭЖХ и масс-спектрометрии высокого разрешения. Анализ полученных данных выявил ряд уникальных белков, характерных для старых клеток, в частности, IGFBP3 (Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3), который был выбран нами в качестве объекта исследования. Данный белок, экспрессия которого значительно повышается в процессе старения эмСК, является компонентом сигнального каскада $p53/PAI-1/IGFBP3$, вероятно, вовлеченного в индукцию преждевременного старения в популяции молодых клеток. Исходя из вышесказанного, целью нашей работы было изучение роли фактора IGFBP3 в паракринном механизме распространения преждевременного старения в культуре эмСК. Методом иммуноферментного анализа была проведена количественная оценка уровня секретированного IGFBP3, механизм секреции которого был установлен путем ингибирования основных сигнальных путей, вовлеченных в старение. Для выявления индукции старения в популяции молодых эмСК при действии IGFBP3 были применены два подхода: истощение по этому белку кондиционной среды от старых клеток посредством специфических антител и оценка эффектов экзогенного IGFBP3. Методом иммунофлуоресценции была визуализирована интернализация экзогенного IGFBP3 в составе ранних эндосом и их внутриклеточная локализация. Важную информацию о механизме паракринного старения должен обеспечить современный подход - получение IGFBP3-нокаутных эмСК с применением CRISPR/Cas9 технологии «редактирования генов». Представленные результаты свидетельствуют о существенном вкладе фактора IGFBP3 в паракринный механизм распространения преждевременного старения в культуре эмСК.

ИНДУКЦИЯ ОСТЕОГЕНЕЗА НА КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩИХ СКАФФОЛДАХ РАЗЛИЧНЫХ МОДИФИКАЦИЙ В ИССЛЕДОВАНИЯХ *IN VITRO*

Буторина Н.Н.^{1*}, Шевелёва О.Н.¹, Паюшина О.В.¹, Домарацкая Е.И.,¹ Истранова Е.В.², Истранов Л.П.²

1. *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия*
 2. *Институт регенеративной медицины ФGAOY BO Первый MГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, Россия*
- **nnbut@mail.ru*

Выбор оптимальных материалов для костной тканевой инженерии остаётся актуальным и на сегодняшний день. Наиболее перспективным материалом, который, выполняя функцию временного направляющего каркаса для регенерации, замещался бы постепенно собственными тканями организма, является биополимер коллаген. На основе литературных данных показано, что геометрия поверхности, размеры пор и каналцев, в скаффолде, собственно микроархитектура скаффолда, даже без учёта влияния ростовых факторов, могут оказывать влияние на клеточную пролиферацию, остеогенную индукцию и остеоиндуктивные свойства, что реализуется через межклеточные взаимодействия. (Садовой М.А., Ларионов М.П. и др., 2014). В наших исследованиях мы сравнили способность к поддержанию индукции остеогенеза на четырёх разновидностях коллагенсодержащих скаффолдах, изготовленных на базе Отдела современных биоматериалов Института регенеративной медицины 1-го МГМУ им. Сеченова – уплотненная губка из реконструированного щелочнорастворенного коллагена дермы коров (биодерм, БД), пленка из разволокненного коллагена дермы коров (БЛК), подслизистый слой тонкой кишки свиньи (sis), и губчатая коллагеновая пластина (ГКП) из реконструированного коллагена дермы коров. Оценку биосовместимости проводили с использованием мезенхимных стромальных клеток, выделенных согласно стандартным протоколам из костного мозга самцов крыс породы Вистар. Образцы скаффолдов засеивали клетками и культивировали 24 дня в остеогенной индукционной среде. Результаты экспериментов оценивали после проведения на срезах реакции на щелочную фосфатазу. По результатам экспериментов наиболее успешно индукция остеогенеза поддерживалась скаффолдами ГКП и sis. По-видимому, эти скаффолды обладают оптимальной микроархитектурой, позволяющей более эффективно индуцировать остеогенную дифференцировку.

Работа выполнена при поддержке Фонда перспективных исследований (аванпроект «Травма-А») с использованием оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОЦИТОВ КРОВИ И КОСТНОГО МОЗГА У БОЛЬНЫХ С ХРОНИЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ

Винс М.В.*, Чумакова С.П., Уразова О.И., Азарова Д.А., Шипулин В.М., Новицкий В.В.

ФГБОУ ВО Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия
* wmw_1991@mail.ru

Цель работы: оценить соотношение классических, промежуточных, неклассических и переходных моноцитов в крови и костном мозге у больных с хронической сердечной недостаточностью на фоне ишемической кардиомиопатии (ИКМП).

Материал и методы. Обследованы 14 больных ИКМП (13 мужчин и 1 женщина) в возрасте 50-64 лет с недостаточностью кровообращения II-III функционального класса по NYHA. У больных утром до операции пластики левого желудочка забирали 5 мл венозной крови и в начале операции 2 мл красного костного мозга из грудины, которые стабилизировали гепарином (25 МЕ/мл). В биоматериале обоих типов определяли относительное содержание классических (CD14⁺⁺CD16⁻), промежуточных (CD14⁺⁺CD16⁺), неклассических (CD14⁺CD16⁺) и переходных (CD14⁺CD16⁻) моноцитов методом проточной цитофлуориметрии, принимая за 100% все клетки, положительные по CD14. Для статистического анализа использовали критерий Манна-Уитни. Различия показателей считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования. Показано, что в крови у пациентов с ИКМП доля моноцитов с фенотипом CD14⁺⁺CD16⁻ составляет 57,77 [46,35; 79,76]%, CD14⁺⁺CD16⁺ – 25,06 [4,96; 42,31]%, CD14⁺CD16⁺ – 5,05 [4,08; 6,58]% и CD14⁺CD16⁻ – 6,03 [3,58; 10,89]%. В костном мозге численность данных субпопуляций моноцитов была в пределах 43,44 [40,54; 44,68]%, 0,16 [0; 1,07]%, 0,54 [0,35; 1,07]% и 54,32 [52,83; 56,08]%, соответственно. Статистически значимые различия между количеством моноцитов одинаковых фракций в крови и костном мозге определялись для всех 4-х субпопуляций клеток ($p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,001$; $p_3 < 0,01$; $p_4 < 0,001$). Таким образом, в костном мозге у больных ИКМП образуются переходные и классические моноциты. Распределение моноцитов на 4 субтипа с преобладанием классических форм клеток происходит в крови, что отражает возможность экстрамедуллярной дифференцировки промежуточных и неклассических моноцитов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ (проект №18-015-00160) и Совета по грантам Президента РФ (проект №НШ-2690.2018.7).

CORD BLOOD ENDOTHELIAL CELLS SUPPORT ERYTHROID DIFFERENTIATION OF HEMOPOETIC CELLS *IN VITRO*

Voytehovich A.S., Vasina E.V., Kastsyunina V.S., Seviaryn I.N., Petyovka N.V.*

National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

*npet@blood.by

Objective: to establish the influence of cord blood endothelial cells on the expansion and maturation of erythroid cells in co-culture *in vitro*.

Methods. Samples of cord blood (CB) were provided by the National Research Center "Mother and Child" (Minsk, Belarus) after informed consent. Endothelial cells (EC) were isolated by culturing a fraction of CB mononucleares in a selective medium with VEGF, FGF, EGF factors. CD34-positive CB cells were isolated by immunomagnetic separation using the EasySep kit (StemCell) according to the manufacturer's instruction. Erythroid differentiation comprised 3 steps. CD34+ cells were cultured with factors IL-3, SCF, EPO from day 0 to 4. Then the cells were co-cultured with CB EC in presence of SCF, EPO from day 4 to 11. At the last 9 days cells were cultured without supporting layer of EC with EPO alone. Control sample was cultured in the same conditions without supporting CB EC monolayer.

Results. More than 95% of isolated EC were CD34⁺CD31⁺CD144⁺CD105⁺CD90⁺CD45⁻ and corresponded to EC precursors. EC formed tubules in angiogenic matrigel test.

On day 7 of differentiation the cells confirmed profile of early erythroid cells CD34⁺CD45⁻CD36⁺CD235⁺. More than 90% of cells expressed Glycophorin A (CD235) in co-cultivation variant and less than 80% in control. On day 11 erythroid cells count was more in co-culture than in control for 30%. Co-culture consists of more than 40% of mature CD235⁺CD36⁻ cells against 30% in control. To the end of differentiation the proportion of mature erythroid cells in co-culture increased to 74% and to 30% in control sample.

Conclusion. Human cord blood endothelial cells support expansion and maturation of erythroid cells in co-culture from 4th to 11th days in presence of SCF and EPO factors.

The research was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research, grant № B16M-090.

ТРАНСКРИПЦИОННЫЕ ФАКТОРЫ GLI ПРОЯВЛЯЮТ АНОМАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ГЛИОМ

Волницкий А.В.^{1*}, Штам Т.А.^{1,2}, Бурдаков В.С.¹, Ковалев Р.А.¹, Конев А.Ю.¹, Филатов М.В.¹

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

2. НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

* voln.a@yandex.ru

Злокачественная трансформация клеток связана с потерей ими дифференцированного статуса. Возможной причиной этого процесса является вовлечение механизмов, обуславливающих стволовое состояние клеток. Транскрипционные факторы *gli1*, *gli2* и *gli3* необходимы для эмбрионального развития позвоночных, в частности для формирования нервной системы. В представленной работе мы изучали активность этих транскрипционных факторов в злокачественных глиомах и их роль в поддержании стволоподобного статуса и выживаемости опухолевых клеток. В исследовании были использованы линии A-172 и T98G, 18 первичных культур клеток злокачественных глиом и образцов нормальной ткани взрослого головного мозга.

В отличие от нормальной ткани головного мозга в глиомах была обнаружена экспрессия генов-мишеней *gli*, включая *gli1*, *foxm1* и *bmi1*. Инкубация с GANT61, специфически ингибирующим транскрипционную активность *gli*, а также нокдаун *gli* с помощью интерференции РНК, вызывали гибель опухолевых клеток. Возможной причиной такого ответа на подавление экспрессии *gli* является наблюдаемое снижение экспрессии генов *gli1*, *foxm1*, *bmi1*, *sox2* и *oct4*, поддерживающих стволовой статус клеток, и гена *tet1*, участвующего в деметилировании ДНК и перепрограммировании клеток.

Интересно, что в некоторых линиях наряду с экспрессией генов-мишеней *gli* было обнаружено высокое содержание транскрипционного репрессора Gli3R, появляющегося в результате сайт-специфического протеолиза белка Gli3. Соотношение Gli3FL и Gli3R в этих линиях было таким же, как в нормальной ткани головного мозга, где не было обнаружено экспрессии генов-мишеней *gli*. Однако нокдаун *gli3* приводил к снижению экспрессии генов-мишеней, указывая, что в клетках глиом *gli3* действует в большей степени как активатор, чем репрессор транскрипции. Мы предполагаем, что в глиомах Gli3R не предотвращает транскрипцию генов-мишеней *gli*, а лишь замедляет ее.

Таким образом, транскрипционные факторы *gli* проявляют аномальную активность в клетках злокачественных глиом, внося значительный вклад в выживаемость и поддержание стволоподобного статуса опухолевых клеток, и вместе с регулируемым ими белками могут рассматриваться как потенциальные мишени адресной терапии глиом, включая иммунотерапию.

Работа поддержана РФФИ 18-015-00289.

ЭКСПРЕССИЯ VEGF МОДУЛИРУЕТ СЕКРЕТОМНЫЙ ПРОФИЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЖИРОВОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА

Гатина Д.З.*, Гаранина Е.Е., Мартынова Е.В., Салафудинов И.И.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

**gatina_dilara@mail.ru*

Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) является перспективным кандидатом для лечения различных сосудистых и ишемических заболеваний человека, поскольку он является одним из основных регуляторов ангиогенеза и может оказывать стимулирующее влияние на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, способствовать формированию новых и восстановлению поврежденных сосудов. Несмотря на широкое применение данного терапевтического гена в составе вирусных и невирусных векторов, остается неизвестным влияние сверх-экспрессии VEGF на секрецию про-воспалительных маркеров.

В представленном исследовании с использованием технологии xMAP Luminex и панелей BioRad Bio-Plex Pro Human Cytokine 27-plex и 21-plex было охарактеризовано влияние генетической модификации рекомбинантными аденовирусами экспрессирующими VEGF (Ad5-VEGF) на секретомный профиль стволовых клеток из жировой ткани человека (СКЖТ).

Трансдукция СКЖТ с помощью рекомбинантного аденовируса пятого серотипа, экспрессирующего VEGF, приводила к повышению экспрессии целевого гена. Результаты ПЦР-РВ показали увеличение экспрессии мРНК VEGF в 2200 раз в генетически-модифицированных клетках по сравнению с нативными клетками.

Проведенный мультиплексный анализ выявил, что СКЖТ секретируют широкий спектр цитокинов, хемокинов и факторов роста. При этом концентрации IL-1b, IL-6, IL-8, MCP-1, VEGF, IL-1a, STACK, GROa, MIG, SCGF-b, SDF-1a, TNF-b, TRAIL составляли больше 100 пг/мл. Так же мы обнаружили увеличение продукции FGF-2, GM-CSF, PDGF-bb, MIP-1b, TNF-a, LIF, M-CSF, TNF-β в СКЖТ трансдуцированными аденовирусом.

Таким образом, СКЖТ трансдуцированные Ad5-VEGF, проявляют повышенную паракринную активность, секретируют проангиогенные и иммуномодулирующие факторы. Данный факт позволяет предположить, что трансплантация модифицированных клеток будет способствовать лучшему их выживанию в трансплантируемой нише, миграции, интеграции, и восстановлению поврежденных тканей за счет секреции терапевтических молекул.

Работа поддержана грантом РФФИ №16-04-01567.

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ СВОЙСТВО Д-АСПАРАГИНА В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Гилевич И.В.^{1*}, Федоренко Т.В.¹, Коломийцева Е.А.¹, Трофименко А.И.², Поляков И.С.¹, Порханов В.А.¹

1. ГБУЗ «Научно-исследовательский институт – Краевая клиническая больница №1 им. проф. С.В. Очаповского» Минздрава Краснодарского края, Краснодар, Россия

2. ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Россия

*giliv@list.ru

Актуальность. В настоящее время известно, что D-аспарагин обладает выраженным антипролиферативным свойством. Это его свойство может быть использовано, когда необходимо замедлить рост грубой рубцовой ткани, например, формирование глияльного или келоидного рубца. Ранее проведенные экспериментальные исследования показали, что чем выше концентрация D-аспарагина, тем сильнее его ингибирующее свойство.

Цель: изучить влияние разного времени воздействия D-аспарагина в концентрации 0,13 г/л на жизнедеятельность дермальных фибробластов человека *in vitro*.

Материалы и методы. В работе была использована культура дермальных фибробластов человека 4-го пассажа. Клетки культивировали при стандартных условиях в питательной среде в течение 72 часов. Время воздействия D-аспарагина на клетки, добавленного в среду, составило: 2, 6, 24 и 48 часов. Для контроля были использованы фибробласты, культивированные без D-аспарагина.

По окончании эксперимента рассчитывали пролиферативную активность и время удвоения клеток. Проводили цитоморфологический анализ и иммуноцитохимические исследования с антителами к p53, ki-67 и виментину.

Результаты. В течение 2-х часов культивирования фибробластов с D-аспарагином отмечается незначительная стимуляция пролиферации клеток: время удвоения клеток сократилось в 1,07 раз ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой, их количество возросло в 1,4 раза ($p < 0,05$). При более длительном воздействии было выявлено угнетение пролиферативной активности: при 48 часовом воздействии D-аспарагина количество клеток снизилось до 70×10^3 /мл (контроль 110×10^3 /мл) и время удвоения клеток увеличилось в 1,2 раза. Цитоморфологическая картина соответствовала клеткам фибробластной природы. Однако при увеличении времени воздействия (более 6 часов) выявлялось много реактивно измененных клеток, разноядерных и укрупненных клеток, единичные дистрофичные и полиморфные клетки. Во всех группах внутриядерной экспрессии белка p53 не было выявлено, реакция на ki-67 была позитивной. Все группы клеток экспрессировали виментин, за исключением 4-й группы (48 часов), а степень повреждения фибробластов в этой группе была глубокой.

Вывод. D-аспарагин обладает выраженным антипролиферативным и угнетающим действием на жизнедеятельность фибробластов при продолжительном влиянии.

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ЗОН ЛОКАЛИЗАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА И ПОВЫШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КРОВИ НА ПРОЦЕССЫ КОЛЛАГЕНООБРАЗОВАНИЯ

Головнева Е.С.^{1*}, Николенко Е.С.¹, Кравченко Т.Г.², Ревель-Муроз Ж.А.²

1. ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», Челябинск, Россия

2. ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», Челябинск, Россия

**micron30@mail.ru*

Актуальность. Основной причиной развития грыжевых дефектов после оперативных вмешательств являются нарушения формирования соединительной ткани в зоне рубца со снижением соотношения коллагена I и III типов. Ранее нами было показано, что под влиянием лазерного воздействия на костный мозг увеличивается выход CD34+ клеток в кровь и усиливаются репаративные процессы в различных поврежденных тканях. Однако не были изучены связи между данным воздействием и процессами коллагенообразования в соединительной ткани.

Цель работы: изучить влияние лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на соотношение коллагена I/III в коже крыс с послеоперационной грыжей.

Материалы и методы. Исследование проведено на 20 крысах с моделью послеоперационной грыжи белой линии живота. В опытной группе на костный мозг воздействовали лазером «ИРЭ-Полус» 980 нм, 1,5 Вт по 3 минуты в первые 5 суток. Животных выводили из эксперимента на 30 суток. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином, толуидиновым синим, иммуногистохимически с использованием антител к коллагену I и III типа (Biorbyt, США) и поливалентной системы с пероксидазной меткой. Статистическая обработка проводилась U-тестом Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение. На 30 сутки объем грыжи был больше в контрольной группе. Морфометрический анализ препаратов кожи показал, что в группе животных, после лазерного воздействия на костный мозг отмечалось усиление дегрануляции тучных клеток, увеличение их количества, количество фибробластов в опытной и контрольной группе достоверно не отличалось. В лазерной группе наблюдался более высокий коэффициент соотношения коллагена I типа к III, что характеризует образующуюся соединительную ткань как функционально более полноценную и свидетельствует об ускорении регенерации при повышении в крови содержания стволовых клеток CD34+ под действием лазера.

МИГРАЦИЯ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ

Гребнев Д.Ю.^{1,2*}, Маклакова И.Ю.^{1,2}, Юсупова В.Ч.¹, Примакова Е.А.³

1. ФГБОУ ВО Уральский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Екатеринбург, Россия
 2. ГАУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
 3. РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ 9-я городская клиническая больница, Минск, Беларусь
- *dr-Grebnev77@mail.ru

Целью исследования являлось изучение направленного движения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенных из плаценты, в различные органы и ткани лабораторных животных в физиологических условиях и после субтотальной резекции печени. Введение клеток производили сразу после выполнения субтотальной резекции. Введение ММСК, меченых акридиновым оранжевым, осуществлялось внутривенно, интраперитонеально, в печеночную артерию, в портальную вену в дозе 4 млн кл/кг. массы тела. Анализ распределения ММСК проводился через 3 и 24 часа.

В результате исследования получено, что через сутки после введения клеток в условиях отсутствия резекции печени не происходит существенных изменений распределения ММСК по сравнению с их распределением через 3 часа. Однако если введение клеток сопряжено с оперативным вмешательством (лапаротомия для обеспечения введения клеток в *v. portae* и *a. hepatica*) происходит снижение их количества в периферической крови.

Через сутки после резекции печени в изучаемых органах и тканях (периферическая кровь, легкое, селезенка, костный мозг, тонкий кишечник, почка) содержание трансплантированных ММСК ниже по сравнению с их количеством в данных органах и тканях без резекции печени в тот же период времени. Обращает на себя внимание значительное увеличение введенных клеток в печени после ее резекции как на 3, так и на 24 часа по сравнению с физиологическими условиями.

РЕЗИДЕНТНЫЕ С-КИТ(+) CD45(-) КЛЕТКИ РЕГУЛИРУЮТ СОСТОЯНИЕ ВАСКУЛОГЕННОГО ПУЛА КЛЕТОК ЭПИКАРДА

Дергилев К.В.^{1*}, Цоколаева З.И.¹, Белоглазова И.Б.¹, Зубкова Е.С.¹, Болдырева М.А.¹,
Парфенова Е.В.^{1,2}

1. *Лаборатория ангиогенеза, Институт экспериментальной кардиологии, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» МЗ РФ, Москва, Россия*

2. *Лаборатория Постгеномных технологий в медицине, Факультет Фундаментальной медицины, Московский Государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*

* doctorkote@gmail.com

Образование новой сосудистой сети является важнейшим этапом регенеративных процессов в сердце и определяет прогноз для пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда. В основе этого процесса лежит активация пула резидентных прогениторных клеток сердца (ПКС), которые путем активации дифференцировки и/или секреции биологически активных молекул, запускают регенеративную программу в клетках миокарда.

Цель исследования — оценить влияние интрамиокардиальной трансплантации ПКС на активацию васкулогенного пула клеток эпикарда.

Крысам-самцам линии Вистар проводили перевязку передней нисходящей коронарной артерии и выполняли интрамиокардиальные инъекции флуоресцентно меченных (CM-DIL+) ПКС или контрольной среды. Через 14 сут. после трансплантации ПКС сохраняли жизнеспособность, и часть клеток проявляла признаки васкулогенной дифференцировки. Морфометрические исследования показали, что достоверных различий в размере площади рубца между группами не было. Однако трансплантация ПКС способствовала уменьшению выраженности негативного ремоделирования: статистически значимому снижению расширения полости ЛЖ (индекса дилатации), уменьшению распространенности трансмурального поражения и артериогенеза в перинфарктной зоне. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов миокарда показало достоверное увеличение количества Wt1+-клеток в эпикарде после трансплантации ПКС в сравнении с контрольной группой, что указывает на активацию эпителиально-мезенхимального перехода и формирование прогениторных клеток эпикарда (ПКЭ). ПКЭ мигрировали в миокард, часть из них коэкспрессировала маркеры CD31 (Pecam), альфа-гладкомышечный актин (α -SMA) и участвовала в построении новообразованных сосудов.

Таким образом, интрамиокардиальная трансплантация ПКС способствует увеличению васкуляризации миокарда, как за счет дифференцировки трансплантированных клеток, так и активации васкулогенных клеток эпикарда, что в свою очередь может приводить к уменьшению постинфарктного ремоделирования сердца.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 17-15-01368 и гранта РФФИ 18-015-00438.

СТАРЕНИЕ И ТКАНЕСПЕЦИФИЧНАЯ ДЕЦИДУАЛЬНАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: РОЛЬ PAI-1

Дерябин П.И., Грюкова А.А., Никольский Н.Н., Бородкина А.В.*

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*borodkina618@gmail.com

Повышенный уровень PAI-1 является фактором риска различных патологий при беременности, включая рецидивирующие невынашивания беременности и повторяющиеся неудачи имплантации. Одним из критически важных периодов беременности, обуславливающим успешность имплантации и последующее развитие эмбриона, является дифференцировка эндометриальных стромальных клеток (эСК) в специализированные эпителиоподобные децидуальные клетки. Недавно стали появляться данные о роли клеточного старения в процессе децидуализации эндометрия и прогрессии различных патологий беременности. Известно, что PAI-1 является одним из основных компонентов, секретируемых стареющими клетками. Более того, именно PAI-1 может опосредовать негативное влияние стареющих клеток на клетки микроокружения. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в исследовании функционального статуса PAI-1 в процессах децидуализации и преждевременного старения эСК, а также в оценке влияния PAI-1, секретирующегося стареющими эСК, на их децидуальную дифференцировку.

В первую очередь был оценен функциональный статус PAI-1 в стареющих эСК. С этой целью клетки подвергали сублетальному окислительному воздействию с последующей оценкой основных параметров клеточного старения. Как и ожидалось, уровень PAI-1 заметно возрастал в стареющих эСК. Более того, при оценке содержания PAI-1 в составе секрета стареющих эСК также было выявлено значительное увеличение содержания этого фактора.

На следующем этапе был оценен уровень PAI-1 в процессе децидуализации эСК. Децидуальная дифференцировка эСК оценивалась по уровню экспрессии важнейших генов децидуальных клеток – *IGFBP-1* и *PRL*, а также по изменению морфологии клеток. Оказалось, что в процессе децидуализации эСК уровень PAI-1 существенно снижается, причем снижение экспрессии детектировалось на протяжении всего времени наблюдения. Полученные результаты были дополнительно верифицированы на трех линиях эСК от разных доноров.

И, наконец, на заключительном этапе мы проверили влияние кондиционированной среды, полученной от старых клеток, содержащей повышенное количество PAI-1, на децидуализацию эСК. Важно, что при такой

постановке эксперимента снижалась экспрессия *PRL* и *IGFBP-1*, свидетельствуя о нарушении децидуальной реакции ЭСК.

Суммируя все полученные результаты, можно сделать следующие выводы: (1) в процессе развития преждевременного старения ЭСК значительно увеличивается экспрессия PAI-1, тогда как при децидуализации уровень этого белка, наоборот, снижается; (2) PAI-1, содержащийся в секрете стареющих клеток, угнетает способность ЭСК к дифференцировке.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

РОЛЬ ОЦЕНКИ ФОСФАТАЗНОГО ИНДЕКСА ПОСЛЕ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ ОСТЕОМИЕЛИТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА

Довгалевиц И.И.^{1*}, Мартинович А.В.²

1. УЗ «6-я городская клиническая больница», Минск, Беларусь

2. БГМУ, Минск, Беларусь

*diidr@yandex.ru

Цель исследования: оценить процессы костного ремоделирования после замещения остеомиелитических дефектов по характеру изменений показателя фосфатазного индекса.

Изучили результаты лечения 198 пациентов с остеомиелитическими дефектами длинных трубчатых костей после замещения аутотрансплантатом в 56 случаях, замороженной аллокостью – 54, мышцей – 46, трансплантационной смесью из измельченного деминерализованного аллотрансплантата, пунктата костного мозга, растворов дексаметазона и аскорбиновой кислоты – 42. Для оценки метаболических нарушений костеобразования, интенсивности процессов резорбции костной ткани и репаративного остеогенеза изучили активность фосфомоноэстераз (щелочной и кислой фосфатаз крови) и их отношение в виде фосфатазного индекса. Анализ проводили относительно «критического» показателя равного 13, что соответствовало средним нормальным значениям. Значение менее 13 свидетельствовало о превалирующих процессах остеорезорбции, более 13 – о повышенной активности остеобластов. Лабораторные исследования проводили перед пластикой, через 7, 30, 60, 90 и 360 дней. При анализе результатов через 360 дней выявили, что фосфатазный индекс составил после аутопластики – 11,60, аллопластики – 21,40, миопластики – 14,40, применения трансплантационной смеси – 12,60. Изученные данные указывали на угасание активности остеобластов и переход к завершающей стадии костеобразования и минерализации трансплантата после аутопластики и использования трансплантационной смеси, замедленную реорганизацию после аллопластики и отсутствие репаративной остеорегенерации и замещение дефекта фиброзной тканью после миопластики.

Таким образом, показатель фосфатазного индекса являлся информативным маркером остеогенеза, отражал соотношение процессов костеобразования и резорбции кости, продолжительность фаз репаративного процесса, характеризовал костное ремоделирование после замещения остеомиелитических дефектов и служил одним из критериев оценки эффективности лечения.

НОРАДРЕНАЛИН ВЫЗЫВАЕТ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Иванова А.М.*, Чечехин В.И, Тюрин-Кузьмин П.А.

*Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультета Фундаментальной
Медицины МГУ имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия
ivanovanastasia14@gmail.com

Воспаление – патологический процесс, направленный на уничтожение агента и регенерацию ткани. Важными участниками воспаления и регенерации являются мезенхимные стромальные клетки (МСК), которые входят в состав большинства тканей организма. МСК также участвуют в регуляции воспаления. МСК влияют на активность клеток иммунной системы путем секреции цитокинов, оказывая противовоспалительное действие. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и нейромедиаторами. Одним из ключевых является норадреналин, который влияет на секреторную активность и дифференцировку МСК. Ранее мы показали феномен переключения внутриклеточной сигнализации, активируемой адренорецепторами: норадреналин, стимулируя бета-адренорецепторы в МСК, вызывает гетерологическую сенситизацию альфа1A-адренорецепторов.

В данной работе мы изучали влияние норадреналина на секреторную активность МСК, связанную с регуляцией воспаления. С помощью методики NanoString мы проанализировали, как изменяется профиль экспрессии более чем 700 цитокинов и других белков, ассоциированных с регуляцией иммунных клеток. Используя PanCancer Immune Profiling Panel, мы показали, что при стимуляции МСК норадреналином происходит увеличение уровня экспрессии РНК целого ряда провоспалительных цитокинов, их рецепторов и участников сигнальных каскадов, активируемых этими рецепторами, и снижение уровня экспрессии противовоспалительных молекул. Также мы дополнительно установили, что при действии норадреналина повышается секреция провоспалительных цитокинов IL-6, IL-8, G-CSF, IFN-G и MCP-1.

Таким образом, мы установили, что воздействие норадреналина на МСК приводит к повышению секреции провоспалительных цитокинов, в то же время клетки сами становятся более восприимчивы к действию этих молекул. МСК переключаются с противовоспалительного на провоспалительный фенотип.

Работа проводилась при поддержке Грантов Президента России МК-3167.2017.7 и РФФ 14-15-00439.

ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАТИВНЫХ СВОЙСТВ КОНДИЦИОНИРОВАННЫХ СРЕД, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, НА МОДЕЛИ «ЦАРАПИНЫ» *IN VITRO*

Ивановская М.М.*, Трифонова А.В., Лаврик А.А.

ООО «Новистем», Санкт-Петербург, Россия

*publication@novistem.ru

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) – ведущие участники в процессе ранозаживления, причем основной свой регенеративный потенциал МСК реализуют опосредованно через паракринное действие секретируемых биологически активных молекул на фибробласты, кератиноциты и другие клетки поврежденной ткани. Благодаря уникальному составу кондиционированных среды, полученные при культивировании МСК (кСМК), могут являться эффективным действующим началом ранозаживляющих препаратов.

Целью исследования было изучение влияния кондиционированных сред, полученных при культивировании МСК собаки, лошади и кошки на миграцию и пролиферацию фибробластов клеточной линии ВНК-21 и первичной культуры фибробластов новорожденных мышей (ФНМ) в модели «царапины» *in vitro*.

На клеточный монослой наносили царапину. Клетки культивировали в базовой среде (контроль), а также в присутствии 10% сыворотки (ФТС) или кСМК в разведениях 1:100, 1:1000 и 1:10000. Через 24 ч оценивали степень зарастания «царапины».

ФНМ и ВНК-21 показали разную способность к миграции и пролиферации, причем ВНК-21 были более активными как в контроле, так и при использовании 10% ФТС. При культивировании ВНК-21 степень зарастания «царапины» в контроле составляла $39,7 \pm 8,7\%$, тогда как в присутствии кСМК данный показатель увеличивался до $50,8 \pm 7,5\%$ (разведение 1:100), $51,6 \pm 12,8\%$ (разведение 1:1000) и $49,9 \pm 12,5\%$ (разведение 1:10000). При культивировании ФНМ степень зарастания «царапины» увеличивалась от $26,6 \pm 9,4\%$ (контроль) до $65,4 \pm 7,3\%$ при разведении кСМК 1:100. Относительная степень зарастания «царапины» достоверно не различалась при использовании кСМК, полученных при культивировании клеток собаки, лошади или кошки.

Добавление кондиционированных сред, полученных при культивировании МСК животных, в ростовую среду фибробластов первичных и перевиваемых культур способствует их миграции и стимулирует пролиферацию в модели «царапины» *in vitro*. Установлено прямое действие на фибробласты паракринных факторов, продуцируемых МСК.

THE ANALYSIS OF ENDOCYTOSIS OF EGF-RECEPTOR COMPLEXES AND EGF-DEPENDENT SIGNALING IN HUMAN ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Istomina M.V.^{1,3*}, Kamentseva R.S.¹, Kosheverova V.V.¹, Kharchenko M.V.¹, Semyonov O.M.², Kornilova E.S.^{1,2,3}

1. *Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia*

2. *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia*

3. *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia*

**mariist@mail.ru*

It is known that endometrial mesenchymal stromal cells (eMSC) express epidermal growth factor receptor (EGFR) at rather high level. However its role in physiology of these cells is studied poorly. The purpose of this work was the research of endocytosis of EGFR and dynamics of activation of major signal pathways from EGFR in eMSC in response to EGF.

After addition of EGF the activation of EGFR and the internalization of EGF/EGFR complexes occur in eMSC. We have found that there were two populations of early endosomes in eMSC as well as in cancer cells line HeLa: a) bearing the autoantigen of early endosomes EEA1, b) bearing the signal protein APPL1. However, unlike HeLa in which EGF/EGFR-positive vesicles after detaching from the plasma membrane interact successively with APPL1- and then with EEA1- positive endosomes, in eMSC the overwhelming part of EGF/EGFR-vesicles colocalizes with EEA1, whereas the colocalization with APPL1 is negligible. Besides, we have shown that in eMSC the considerable fraction of EGF/EGFR-containing vesicles was delivered to lysosomes only by 120 minutes after stimulation of cells with EGF, whereas in HeLa the peak of colocalization of EGF-vesicles with LAMP1 was by 60 minutes after stimulation of cells by EGF.

Also, we have followed the dynamics of activation of major signal pathways from EGFR after stimulation of eMSC by EGF. Unlike HeLa in which activation of MAP-kinase Erk is transient, the long activation of MAPK (Erk2)- and Akt- cascades is characteristic for eMSC.

Thus, the features of endocytosis of EGF-receptor complexes and EGF-dependent signaling are revealed in eMSC. It gives prospects for the further research of EGF/EGFR-dependent system in cells with proliferative activity during the self-renewing period.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00188.

THE DYNAMICS OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING AND ENDOCYTOSIS IN THE ENDOMETRIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS UNDER TGF- α TREATMENT

Kamentseva R.S.^{1*}, Kosheverova V.V.¹, Istomina M.V.^{1,3}, Kharchenko M.V.¹, Semyonov O.M.², Kornilova E.S.^{1,2,3}

1. *Institute of Cytology RAS, Saint Petersburg, Russia*

2. *Saint Petersburg State University, Saint Petersburg, Russia*

3. *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia*

**rkamentseva@yandex.ru*

Mesenchymal stromal cells derived from human desquamated endometrium (enMSC) have an advantage among MSCs in non-invasive isolation technique. The tissue-specific functions of enMSC are regulated among others by epidermal growth factor receptor (EGFR). Now seven native ligands of EGFR are known that are different in their signaling outcome and intracellular fate after internalization. For example, EGFR-TGF- α complex dissociates in early endosomes (EE) at intra-endosomal pH 6.0-6.5, resulting in EGFR deactivation and its recycling to the plasma membrane, whereas EGFR-EGF complex dissociates at pH<5.0, with EGFR being active until delivery to late endosomes (LE). In bone marrow-derived MSC EGF and TGF- α also were shown to have different effects, with EGF increasing proliferation and TGF- α regulating paracrine activity.

However, we have shown previously that the both TGF- α and EGF increased enMSC proliferation. In this study we analyzed the dynamics of EGFR signaling and endocytosis in enMSC treated with TGF- α . We have found that in this case EGFR persisted in endosomes for more than two hours. EGFR-containing vesicles colocalized first with EE and later with lysosomes as in the case of vesicles containing EGFR-EGF complex. The dynamics of EGFR phosphorylation was similar under EGF and TGF- α treatment which suggests the prolonged association of both ligand-receptor complexes. However, the dynamics of Erk1/2 and Akt activation was slightly different under treatment with the two ligands.

Thus, our results assume that the dynamics of endosomes acidification in enMSC differs from that described in other cell lines. This may result in specific mechanisms of regulation of EGFR signaling coupled with regulation of its endocytosis in these cells.

The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-34-00188.

AORTIC ROOT DECELLULARIZATION IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE MEDIUM: A PILOT STUDY.

Kapomba S.B.¹, Veryasova N.N.^{1*}, Kuryanova A.S.¹, Kurkov A.V.¹, Isaev D.E.¹,
Timashev P.S.¹

*Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine,
Moscow, Russia*

**byronkaps@gmail.com*

Valve replacement remains the last therapeutic option for patients with severe aortic valve dysfunction unsuitable for valvular reconstruction. But one of the greatest challenge in tissue engineering is development of prosthetic heart valves. Tissue engineering is a promising approach that may lead to novel constructs that will satisfy this unmet need and overcome the limitations of current valve prosthetics such as appropriate hemodynamic behaviour and biocompatibility. Decellularized heart valves are composed of biological components that can give a positive impact on cell differentiation and serve a building blocks during remodelling process. Decellularization is aimed to decreased adverse immune response from the recipient's body. One of the disadvantage of currently used decellularization protocols is long duration of the process (about 14 days).

Our project aims to develop the aortic root decellularization protocol utilizing supercritical carbon dioxide (scCO₂) medium as non-toxic agent, which has ability to eliminate lipids and other cell compounds in a short period (several hours).

In order to investigate impact of scCO₂ to decellularization process ovine aortic roots were divided into 2 groups. Group 1: samples underwent conventional SDS/SD treatment with washing in PBS (protocol took 14 days). Group 2: samples were treated with SDS/SD with further scCO₂ washing (protocol took 3 days). Efficiency of decellularization was examined via hematoxylin-eosin staining. Picrosirius red staining shows the preservation of collagen in leaflets. Mechanical properties were investigated for leaflets.

The comparative analysis of the samples provided new insights into decellularization of complex 3D-structures and paved the way for further investigations.

This work was performed with the support of the Russian Science Foundation under grant # 18-15-00401 and grant from Sechenov University.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ И СПЕЦИФИЧНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МИКРОВЕЗИКУЛ С КЛЕТКАМИ-МИШЕНЯМИ

Клетухина С.К.*, Гомзикова М.О., Курбангалеева С.В., Неустроева О.А.,
Ризванова А.А.

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, Россия

**sevindzh.rasulova.1993@mail.ru*

Введение. Микровезикулы (МВ) - это сферические окруженные цитоплазматической мембраной микроstructures, которые способны переносить биологически активные молекулы. Поверхностные рецепторы МВ участвуют в распознавании и специфическом связывании с поверхностными белками клетками-мишеней. Поэтому МВ являются перспективной векторной системой для целенаправленной доставки лекарств. В настоящее время разрабатывают способы доставки наночастиц, красителей и химиопрепаратов с помощью мембранных везикул, индуцированных цитохалазином В (МВ-ЦВ). Однако эффективность доставки и специфичность взаимодействия МВ-ЦВ с клетками-мишенями изучена не была.

Материалы и методы. МВ-ЦВ получали от клеток-доноров (PC3, HeLa) с помощью цитохалазина В. Размер полученных МВ-ЦВ и эффективность слияния с клетками-реципиентами оценивали с помощью проточной цитометрии (BDFACS Aria III, Guava EasyCyte 8HT) и лазерной конфокальной микроскопии (Carl Zeiss LSM 780).

Размер МВ-ЦВ PC3 составил от менее 220 нм - 1340 нм (95% МВ-ЦВ). Мы обнаружили, что МВ-ЦВ PC3 преимущественно связываются и проникают в клетки-мишени линии HeLa (86.96±1.46% клеток, содержащих мембранный компонент МВ-ЦВ PC3), по сравнению с клетками-мишенями PC3, SH-SY5Y, HCT116 (56,81±0,41%, 59,46±3,8%, 58,95±3,9 % клеток, соответственно). Ингибирование эндоцитоза (путем снижения температуры до 4 °С) привело к снижению эффективности проникновения МВ-ЦВ PC3 на 15.36 - 33.5%, тогда как разрушение поверхностных рецепторов (обработка протеиназой К) снизила эффективность проникновения МВ-ЦВ PC3 на 33.8-85.6%. Разрушение поверхностных рецепторов оказало наибольшее влияние на эффективность проникновения МВ-ЦВ в клетки-мишени HeLa (снижение составило 85.6±4.2%).

При нанесении на клетки-реципиенты МВ-ЦВ, полученных от клеток, окрашенных 2,5 μM CFDA SE, в концентрации белка 15,62; 62,5; 125 и 250 μг/мл, через 24 часа инкубации наблюдали 9,15±2,03; 24,9±1,14; 67,98±2,07; 84,52±1,36 % CFDA+-клеток, соответственно; а от клеток, окрашенных 10 μM CFDA

SE, наблюдали результат $36,1 \pm 4,4$; $50,8 \pm 3,9$; $73,3 \pm 7,74$; $89,81 \pm 0,6$ % CFDA+ клеток.

Вывод. Мы обнаружили, что нет статически значимых предпочтений в слиянии МВ-ЦВ с клетками-мишенями того же типа (гомофильное взаимодействие). Нарушение поверхностных рецепторов оказало наибольшее влияние на проникновение МВ-ЦВ РСЗ в клетки-мишени, что свидетельствует о том, что гетерофильное взаимодействие является более значительным в процессе распознавания и слияния внеклеточных везикул с клетками-мишенями. А также мы показали, что эффективность доставки флуоресцентного красителя в клетку-реципиента зависит от концентрации наносимых МВ-ЦВ и концентрации загруженного в МВ-ЦВ вещества.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВОЧНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПУЛПЫ МОЛОЧНОГО ЗУБА

Кольцова А.М.*, Зенин В.В., Турилова В.И., Яковлева Т.К., Полянская Г.Г.

ФГБУН Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия

**koltsova.am@mail.ru*

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) обладают уникальными свойствами, позволяющими их использовать как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Являясь диплоидными и неиммортизированными, МСК представляют собой адекватную модель для изучения биологических процессов в здоровом организме. МСК разного происхождения, как правило, обладают рядом общих свойств. Однако это не исключает возможности межлинейных различий по характеристикам, определяющим статус МСК, и другим признакам, отражающим свойства определенной линии.

Целью данной работы было получение клеток из пульпы выпавшего естественным путем молочного зуба ребенка и проверка их характеристик с позиции их соответствия статусу МСКч.

Клетки из пульпы молочного зуба выделяли механически, путем выскребания содержимого канала и промывания его средой. Для полученной клеточной линии MSC-DP был характерен нормальный кариотип человека 46 XX. Клетки активно пролиферировали, экспрессировали все поверхностные маркеры МСКч. При длительном культивировании (до 25 пассажа), их пролиферативная активность постепенно снижалась, в то время как нарастала активность β -галактозидазы – маркера старения. Экспрессия поверхностных маркеров МСКч в клетках на поздних пассажах оставалась неизменной. Гистохимическая окраска подтвердила возможность направленной дифференцировки клеток MSC-DP в остеогенном и хондрогенном направлениях. Адипогенную дифференцировку не удалось выявить ни при окраске клеток жировым красным (присутствие капель липидов), ни при помощи ОТ-ПЦР на экспрессию рецептора Glut4. Однако, индукция нейрональной дифференцировки способствовала усилению гена NSE в клетках, что, в свою очередь подтверждает мультипотентный статус клеток MSC-DP. В целом, представленные результаты подтверждают статус МСК для полученной линии и свидетельствуют о существенных изменениях ряда свойств клеток, происходящих в процессе репликативного старения.

EGF AND TGF α DECREASE CD146+ POPULATION OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Kosheverova V.V.^{1*}, Kamentseva R.S.¹, Kharchenko M.V.,¹ Istomina M.V.,³ Semyonov O.M.,² Shatrova A.N.,¹ Domnina A.P.,¹ Kornilova E.S.^{1,2,3}

1. *Institute of Cytology RAS, Saint-Petersburg, Russia*
 2. *Saint Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*
 3. *Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia.*
- * *kosheverova_vera@incras.ru*

Mesenchymal stromal cells (MSC) of different origin are known to be heterogeneous by its proliferative potential as well as by the expression of cell surface markers. The problem of identifying the «true» stem cells by discovering stem cell specific markers is not decisively decided yet. One of the potential mesenchymal stem cell markers is proposed by many researches to be CD146, or MCAM (melanoma cell adhesion molecule). Namely, it was previously shown that CD146⁺ MSC are found to have higher proliferation and differentiation potential than CD146⁻ MSC ones (Lv et al., 2014).

We have found previously that human desquamated endometrium-derived MSC (enMSC), isolated and characterized earlier in our department (Zemelko et al., 2011), express growth factor receptor (EGFR) at high level similar to that in HeLa cells. However the role of EGFR signaling in enMSC is still obscure. In the present study we examined the effect of the two main ligands of EGFR, EGF and TGF α , on the proliferation and cell surface expression of CD146 using flow cytometry analysis. We have revealed that about 50% of the total enMSC population showed CD146⁺ phenotype. EGF as well as TGF α addition led to the increase of enMSC proliferation. Surprisingly, both ligands treatment also resulted in the decrease of the CD146⁺ enMSC amount up to 10-15%. Seeding the cells at different initial concentrations we have shown that this effect was not due to the increase of the cell density following proliferation stimulation. These results allow us to speculate that CD146⁺ and CD146⁻ enMSC subpopulations respond differently on EGF receptor activation.

The study was supported by Russian Foundation of Basic Research (project № 18-34-00188).

EXTENSION OF MAXIMAL LIFE SPAN AND HIGH BONE MARROW CHIMERISM AFTER NONMYELOABLATIVE SYNGENEIC TRANSPLANTATION OF BONE MARROW FROM YOUNG TO OLD MICE

Kovina M.V.¹, Karnaukhov A.V.², Krashennnikov M.E.¹, Kovin A. L.¹, Gazheev S.T.¹,
Sergievich L.A.², Karnaukhova E.V.², Bogdanenko E.V.³, Balyasin M.V.¹, Khodarovich
Y.M.⁴, Dyuzheva T.G.⁵, Lyundup A.V.¹

1. *Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine; 119991, Trubetskaya street, bldg. 8, Moscow, Russia, gershi2001@yahoo.com*
2. *Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*
3. *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*
4. *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*
5. *City clinical hospital №7 of Yudin, Moscow, Russia*

The increase in MLS, maximum life span, is the most significant indicator of affecting the basic mechanisms of aging, in particular, with regard to age-related loss of stem cells. To determine the effect of nonablative syngeneic transplantation of young bone marrow (BM) to laboratory mice of advanced age, transplantation of 100 million nucleated cells was performed at the time when half of the recipient population had already died. As a result, MLS defined as the average life span of 10% of the longest-living mice, increased by $31 \pm 3\%$ in the experiment comparably to control group, and the survival time from the beginning of the experiment increased 3 ± 0.3 -fold. The life-extending effect was significantly stronger than in earlier works with similar design (no irradiation or chemotherapy, no hereditary pathologies in recipients, advanced age at the start of the BM administration) because of (i) the larger amount of transplanted material and (ii) a close relation of the donors and recipients. The chimerism of the bone marrow 6 months after the transplantation was 28%. The result is encouraging for clinical adaptation for aged humans (70-80-years old). The richest source of highly proliferative mesenchymal stem cells is menstrual blood. Mass cryobanking of stem cells of young people would solve the issue of donation, which is very acute already now and might become even more complicated in the future, especially in view of geriatric application of stem cells.

ADVANCED ISOLATION AND NEW FEATURES OF MENSTRUAL MSCs

Kovina M.V., Krasheninnikov M.E., Dyuzheva T.G., Danilevsky M.I., Klabukov I.D., Balyasin M.V., Chivilgina O.K., Lyundup A.V.

Sechenov First Moscow State Medical University, Institute for Regenerative Medicine, Moscow Russia
gershi2001@yahoo.com

Menstrual blood is only recently and still poorly studied, but it is an abundant and noninvasive source of highly proliferative mesenchymal stem cells (MSCs). However, no appropriate isolation method has been reported due to its high viscosity and high content of clots and desquamated epithelium. We studied different isolation approaches and their combinations: ammonium-containing lysing buffer with two distilled water and gradient-density centrifugation. Resulting isolation method yields up to four million nucleated cells per milliliter of initial blood, of which about 0.2-0.3% are colony-forming cells expressing standard mesenchymal markers CD90, CD105, and CD73, but not expressing CD45, CD34, CD117, CD133, or HLA-G. The cells have high proliferative potential (doubling in 26 h) and the ability to differentiate into adipocytes and osteocytes. Early endometrial MSCs (eMSCs) express epithelial marker cytokeratin 7 (CK7). CK7 is easily induced in later passages in a pro-hepatic environment. We show for the first time that a satisfactory and stable yield of eMSCs is observed throughout the whole menstrual period (five consecutive days) of a healthy woman. The new cost/adequate method allows isolation from menstrual blood a relatively homogenous pool of highly proliferative MSCs, which seem to be the best candidates for internal organ therapy due to their pro-epithelial background (early expression of CK7 and its easy induction in later passages) and for mass cryobanking due to their high yield and availability.

**ПОЛИМЕРНЫЕ СКАФФОЛДЫ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦАМИ
ДИОКСИДА ЦЕРИЯ (CeO₂), ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК (МСК) ЧЕЛОВЕКА
IN VITRO**

Колманович Д.Д.^{1*}, Попов А.Л.², Шекунова Т.О.^{3,4}, Козлов Д. А.³, Савинцева И.В.²,
Попова Н.Р.², Аккизов А.Ю.¹, Иванов В.К.⁴

1. КБГУ им. Х.М. Бербекова, Нальчик, Россия
 2. ИТЭБ РАН, Пущино, Россия
 3. МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия
 4. ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова, Москва, Россия
- *antonpopovleonid@gmail.com

Одним из наиболее перспективных наноматериалов биомедицинского назначения является нанокристаллический диоксид церия (CeO₂). Низкая токсичность, высокая степень биосовместимости и уникальные антиоксидантные свойства делают этот наноматериал одним из наиболее перспективных для целей регенеративной медицины. Способность наночастиц CeO₂ стимулировать пролиферацию стволовых клеток в культуре с сохранением их дифференцировочного потенциала и нативного иммунофенотипа позволяет использовать его в различных материалах для регенеративной медицины.

Используя метод послойной адсорбции разнозаряженных полиэлектролитов на твердую подложку (layer-by-layer), были приготовлены гибридные скаффолды, состоящие из 6 слоев биосовместимых полиэлектролитов и 2 слоев цитрат-стабилизированных наночастиц CeO₂ (3-6 нм), на которые высевали МСК человека и культивировали в течение 7 суток.

Было показано, что скаффолды, модифицированные наночастицами, обеспечивали хорошую адгезивность поверхности, обеспечивали активную пролиферацию и миграцию МСК. Анализ клеточной культуры выявил достоверное увеличение числа активно пролиферирующих клеток по сравнению со скаффолдами без наночастиц. Анализ структуры актинового цитоскелета методом флуоресцентной микроскопии дополнительно подтвердил активную пролиферативную и миграционную активность МСК на модифицированных наночастицами скаффолдах.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта РФФИ и Правительства Московской области № 17-44-500718.

ФОРМИРОВАНИЕ СФЕРОИДОВ В ПРОЦЕССЕ ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ПОЛИЛАКТИДНОЙ ПОДЛОЖКЕ, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ХОНДРОИТИНСУЛЬФАТОМ

Копелев П.В.*, Александрова С.А., Нащекина Ю.А., Блинова М.И.

ФГБУН Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*paха94@bk.ru

Актуальность исследования вызвана необходимостью разработки методов получения сфероидов для целей тканевой инженерии. Клетки в составе сфероидов обладают повышенной выживаемостью при трансплантации, активнее вырабатывают внеклеточный матрикс. Для внесения сфероидов в некоторые ткани, в частности, хрящевую, требуются носители, состав которых может оказывать влияние на свойства клеток. **Цель работы:** проанализировать влияние модификации хондроитинсульфатом (ХС) полилактидной (ПЛ) подложки на формирование сфероидов из стромальных клеток в процессе хондрогенеза. **Материалы и методы.** В работе использовали подложки (пленки) из поли(L-Л)лактида, которые модифицировали раствором ХС. На подложки наносили суспензии клеток разных типов и помещали их в хондрогенную среду. Использовали первичные культуры хондроцитов (ХЦ), мезенхимных стромальных клеток костного мозга (МСК КМ) и синовиальной ткани (МСК СТ), полученные из конечностей новорожденного кролика. Каждые 3-4 суток проводили фотофиксацию под микроскопом растущих клеток в течение 10 суток. С помощью программы ImageJ измеряли диаметр сфероидов. **Результаты.** Было выявлено, что в условиях хондрогенеза на третьи сутки МСК КМ формировали сфероид при росте на ПЛ подложке, модифицированной ХС. В то же время при росте на подложке без модификации наблюдалось только несколько хондрогенных узелков. К 7-м суткам сфероиды формировались во всех вариантах опыта. МСК СТ формировали сфероиды уже на первые сутки на подложке из ПЛ, а на третьи сутки обнаружены сфероиды во всех вариантах опыта. Количество сфероидов к 10-м суткам увеличивалось, больше всего на подложках с ХС. При культивировании ХЦ наблюдалась аналогичная картина. **Заключение.** Модификация ПЛ подложек ХС оказывает положительное влияние на скорость формирования сфероидов МСК КМ. В то время как клетки других культур быстрее формировали сфероиды на немодифицированных подложках.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ 14-50-00068 «Стволовые клетки - основа клеточных технологий».

ОСОБЕННОСТИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ЭКСПРЕССИИ P2Y-РЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Котова П.Д.

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
polinakotova88@gmail.com*

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) представляют собой мультипотентные клетки, способные дифференцироваться как минимум в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях. За счет своей способности к дифференцировке и доступности выделения из тканей взрослого организма МСК обладают большим потенциалом для использования клеточной терапии и регенеративной медицине. Пуринергические рецепторы являются одними из самых распространенных рецепторов, а связанные с ними сигнальные системы вовлечены регуляции многочисленных функций в различных клетках. В данной работе мы исследовали функциональную экспрессию P2Y-рецепторов МСК. Эксперименты проводили на первичной культуре МСК, выделенных из жировой ткани 4 доноров.

Экспрессионный анализ P2Y-рецепторов методом ОТ-ПЦР выявил, что образцы РНК всех доноров содержали транскрипты генов P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₃, P2Y₁₄ рецепторов, в то время как транскрипты гена P2Y₁₂ рецептора не были выявлены ни в одном из образцов. Анализ функциональной активности P2Y-рецепторов проводили на одиночных МСК тех же доноров с использованием микрофотометрии (Ca²⁺-imaging) и Ca²⁺-зонда Fluo-4, природных и специфических агонистов и антагонистов P2Y рецепторов. Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что в МСК функционируют P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₃ рецепторы.

Интересным фактом стало то, что нами были выявлены индивидуальные особенности функционирования пуринергических рецепторов МСК у различных доноров. Главной особенностью стало то, что P2Y₆-рецептор функционировал лишь у одного донора из четырех. Малочисленная популяция клеток одного из доноров генерировала ответы и на природный (UDP), и на специфический (MRS 2693) агонисты P2Y₆-рецептора, тогда как в МСК остальных трех доноров таких клеток обнаружено не было. Стоит отметить, что ОТ-ПЦР анализ выявил наличие P2Y₆-рецептора в образцах МСК всех доноров, различия наблюдались лишь в функционировании этого рецептора. Для выяснения причин и следствий этого феномена необходимо проведение дальнейших исследований, однако он демонстрирует принципиальную возможность донор-зависимых различий в рецепторной системе МСК.

Работа поддержана стипендией Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам СП-924.2018.4.

DONOR-DEPENDENT FEATURES OF P2Y RECEPTOR EXPRESSION IN MESENCHYMAL STROMAL CELLS

Котова П.Д.

*Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия
polinakotova88@gmail.com*

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are undifferentiated multipotent cells that can differentiate at least in the osteogenic, chondrogenic and adipogenic directions. Due to their ability to differentiate and considering the fact that they can be isolated from the tissues of an adult organism, MSCs are thought to be a promising object for practical use in cell therapy and regenerative medicine. Purinergic receptors are one of the most common receptors, and associated signaling systems are involved in paracrine and autocrine regulation of numerous functions in a wide variety of cells. We investigated the functional expression of P2Y receptors of MSCs. The experiments were performed on a primary culture of MSC isolated from adipose tissue of four donors.

Expression analysis of purinergic receptors by RT-PCR revealed that the RNA samples of all donors contained transcripts of the genes P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13, P2Y14 receptors, while transcripts of the P2Y12 receptor gene were not detected in any of the samples. Analysis of the functional activity of purinergic MSC receptors was performed on single MSCs of the same donors using Ca²⁺-imaging and Ca²⁺-indicator Fluo-4, natural and specific P2Y-receptor agonists and antagonists. The results of the experiments indicate that P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y13 purinergic receptors function in the MSC.

An interesting fact was that we identified individual features of the functioning of purinergic receptors MSC in different donors. The main individual feature of donors was that the P2Y6 receptor functioned only for one donor out of four. A small population of cells from one of the donors generated responses to both natural (UDP) and specific (MRS 2693) P2Y6 receptor agonists, whereas in the MSC the remaining three donors of such cells were not detected. It should be noted that RT-PCR analysis revealed the presence of the P2Y6 receptor in the samples of MSCs of all donors, differences were observed only in the functioning of this receptor. To clarify the causes and consequences of this phenomenon, further research is needed, but it demonstrates the fundamental possibility of donor-dependent differences in the MSC receptor system.

This work was supported by the Russian Science Foundation (grant 17-75-10127).

ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНОГО СОСТАВА И ИММУНОФЕНОТИПА МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Курбангалеева С.В., Гомзикова М.О.* , Клетухина С.К., Неустроева О.А.,
Ризванов А.А.

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, биологический факультет, Казань, Россия*
**marina.gomzikova.gmo@gmail.com*

На сегодняшний день перспективным инструментом клеточной терапии являются стволовые клетки. СК обладают способностью дифференцироваться в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях. Однако использование стволовых клеток несет риски онкотрансформации, формирования опухолей, а также дифференцировки в нежелательном направлении. Внеклеточные везикулы безопасны и являются естественным вектором в организме человека для межклеточной коммуникации и передачи биологически активных веществ. Внеклеточные везикулы содержат в своем составе мРНК, микроРНК, миРНК, различные белки и липиды, полученные ими от родительских клеток.

В настоящей работе нами были получены индуцированные с помощью цитохалазина В мембранные везикулы (МВ-ЦВ) из мезенхимных стволовых клеток (МСК). Цитохалазин В способствует стимуляции отпочковывания мембранных везикул, так как блокирует полимеризацию актиновых микрофиламентов цитоскелета, что делает клетки пластичными и позволяет большому количеству МВ отделиться от клетки при интенсивном перемешивании.

Так как поверхностные рецепторы стловых клеток являются критерием стволовости, а также участвуют в межклеточной коммуникации, мы исследовали иммунофенотип родительских МСК и полученных МВ-ЦВ. Для этого мы проводили иммуноокрашивание с последующей оценкой методом проточной цитофлуориметрии. Для характеристики молекулярного состава МВ-ЦВ МСК нами был проведен мультиплексный анализ, который позволяет оценить концентрацию широкого спектра биологически активных молекул в составе МВ-ЦВ МСК.

Нами были выделены МВ-ЦВ из МСК человека, крысы, мыши с помощью цитохалазина В и было обнаружено, что МВ-ЦВ несут рецепторы характерные для МСК человека (CD90, CD29, CD44, CD73), МСК мыши (CD90.2, CD44, CD49e), МСК крысы (CD90.1, CD49e, CD29) и содержат все исследованные факторы роста (EGF, FGF-2, VEGF), цитокины (G-CSF, GM-CSF, Flt-3L) и хемокины (IP-10, MCP-1) подобно клеткам родителям.

Согласно результатам, молекулярный состав мембранных везикул и мезенхимных стволовых клеток, из которых они были получены МВ-ЦВ – идентичен, что свидетельствует о наличии высокой биологической активности МВ-ЦВ, подобно клеткам-донорам МСК.

АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК ЛИНИИ JURKAT В УСЛОВИЯХ СОКУЛЬТИВИРОВАНИЯ С ММСК В ПРИСУТСТВИИ ТРЕХМЕРНОГО КАЛЬЦИЙФОСФАТНОГО МАТРИКСА

Литвинова Л.С.^{1*}, Юрова К.А.¹, Шуплецова В.В.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Мелашенко Е.С.¹, Мелашенко В.В.¹, Шунькин Е.О.¹, Шаркеев Ю.П.², Комарова Е.Г.², Видонова М.А.¹, Прокин К.А.¹, Хлусов И.А.^{1,3}

1. Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия

2. Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

3. Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

*larisalitvinova@yandex.ru

Исследовано влияние трехмерного (3D) кальцийфосфатного (КФ) матрикса на жизнедеятельность Т-лимфобластоподобных лейкозных клеток Jurkat при их сокультивировании с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК). В качестве матрикса применяли титановые подложки диаметром 10-12 мм, несущие КФ микродуговое покрытие с коэффициентом шероховатости поверхности Ra 2-5 мкм. 14-дневное сокультивирование клеток Jurkat с ММСК приводило к увеличению экспрессии на лейкозных клетках молекул ранней и поздней активации (CD25⁺ и CD95⁺) по сравнению с контрольной группой (2D культура Jurkat). Аналогичные изменения наблюдались при добавлении 3D матрикса к культуре клеток Jurkat. В случае культуры “Jurkat+ММСК+3D матрикс” число CD95⁺ Jurkat клеток снижалось (на 25%), а CD25⁺ увеличивалось (в 1.5 раза) в сравнении с 2D культурой Jurkat+ММСК. Система визуализации Cell-IQ позволила выявить отрицательную динамику (по сравнению с 2D сокультивированием) роста популяции клеток Jurkat при сокультивировании с ММСК в присутствии 3D матрикса, а также возрастание способности к адгезии и двигательной (амебоподобные движения) активности крупных (полиплоидных) клеток Jurkat. В присутствии клеток Jurkat значительно возрастала окраска ализариновым красным (кальцифицированный межклеточный матрикс) 21-суточной 2D и 3D культуры ММСК.

Морфофункциональное взаимодействие ММСК и Jurkat, модулируемое шероховатым КФ матриксом, требует подробной расшифровки в интересах регенеративной медицины и биоинженерии костной ткани в условиях опухолевого роста.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-15-10031).

МИГРАТОРНАЯ АКТИВНОСТЬ ММСК ПРИ СОКУЛЬТИВИРОВАНИИ С МОНОНУКЛЕАРНЫМИ ЛЕЙКОЦИТАМИ КРОВИ *IN VITRO*

Литвинова Л.С.^{1*}, Юрова К.А.¹, Шуплецова В.В.¹, Хазиахматова О.Г.¹, Мелашенко Е.С.¹, Шаркеев Ю.П.², Комарова Е.Г.², Седелникова М.Б.², Горбунова А.В.¹, Радионова А.А.¹, Горбунова Е.А.³, Хлусов И.А.^{1,3}

1. Балтийский федеральный университет имени И. Канта, Калининград, Россия

2. Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Томск, Россия

3. Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия

* larisalitvinova@yandex.ru

Современным инструментом клеточной биологии для анализа миграции клеток в реальном времени *in vitro* является электродная система RTCA-DP (real-time cell analysis).

Исследовали мононуклеарные лейкоциты (МНК; 95% CD3⁺ клеток) и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека (Разрешение №7 от 09.12.2015 ЛЭК БФУ им. И. Канта). Оценивали их миграторную активность через поры в мембране диаметром 8 мкм (верхняя камера 16-луночных планшетов RTCA-DP) в условиях моделирования их непрямого контакта. Варианты культивирования: 1) инвазия ММСК (из верхней камеры) в нижнюю с полной питательной средой (ППС); 2) инвазия ММСК в нижнюю камеру с МНК; 3) инвазия МНК в ППС; 4) инвазия МНК в нижнюю камеру с ММСК. В нижнюю камеру добавляли Т-клеточный активатор (анти-CD2/CD3/CD28-частицы) в соотношении к числу клеток 2:1. Клетки ($4 \cdot 10^4$) культивировали в микрокамерах (160-180 мкл) в течение 72 ч. при 37 °С, 5% CO₂.

Изменение импеданса в RTCA, коррелирующего с числом мигрирующих клеток, показало инвазию ММСК-ЖТ через микропористую мембрану (индекс клеточной миграции (ИКМ) до 1,75 условных единиц (у.е.) импеданса к 40 ч наблюдения). Активированные МНК достоверно усиливали хемотаксис ММСК (ИКМ до 3,5 у.е. к 45 ч). Активированные МНК слабо мигрировали в течение 72 ч (ИКМ не более 0,15 у.е.), ММСК-ЖТ незначительно стимулировали данный процесс (до 0,32 у.е. ИКМ). Неожиданным оказалось усиление инвазии ММСК-ЖТ только анти-CD2/CD3/CD28-частицами (до 2 у.е. ИКМ к 30 ч), находившимися в нижней камере.

Таким образом, хемоаттрактантом для ММСК являются как продукты активированных МНК, так и Т-клеточный активатор. Результаты имеют значение для разработки технологий стимуляции миграции ММСК в воспалительный очаг в целях регенеративной медицины.

Работа выполнена за счет гранта РФ № 16-15-10031.

СТИМУЛЯЦИЯ РОСТА ПЛОДОВ КРЫС ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ПЕРИОД ГАСТРУЛЯЦИИ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРЫС ИЛИ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

Михайлов В.М.¹, Соколова А.В.¹, Иволгин Д.А.^{2,3}

1. Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

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

vmikhailov@incras.ru

У человека и животных с интерстициальной трансплантацией и гемохориальным типом плаценты в матке дифференцируются децидуальные клетки (ДК), которые образуют материнскую часть плаценты. В отсутствие ДК развитие останавливается на стадии сомитов. Ранее нами было показано, что трансплантация клеток костного мозга (ККМ) небеременных крыс стимулирует развитие ДК у псевдобеременных крыс. Представляет интерес изучение влияния ККМ беременных крыс на развитие плодов при трансплантации на начальных сроках беременности.

Мононуклеары КМ крыс 4-13 дней беременности вводили внутривенно самкам того же срока беременности. Вес и морфологию плодов оценивали на 18 день беременности. Было обнаружено, что трансплантация ККМ на 7-9 дни беременности достоверно увеличивала вес плодов до 835 ± 15 мг по сравнению с весом плодов небеременных самок (745 ± 11 мг) и весом плодов самок, которым вводили ККМ диэструсных самок (772 ± 9 м). Введение ККМ на 11-12 дни беременности снижало вес плодов до 587 ± 5 мг.

Представляет интерес - могут ли клетки пуповинной крови (КПК) влиять на рост плодов крыс при трансплантации самкам крыс. В работе использовали мононуклеарную фракцию ПК, которые вводили подкожно в дозах 26 или 71×10^6 клеток на 250 г веса животных. Вес плодов на 18 день беременности был максимальным (856 ± 8 мг) при введении КПК на 9-й день беременности. При введении КПК на 11 день беременности вес плодов уменьшился до 803 ± 19 мг. При уменьшении дозы КПК до 26×10^6 вес плодов на 9-й беременности понизился до 813 ± 17 мг. Таким образом, как ККМ крыс, так и КПК человека стимулируют вес плодов 18 дня беременности после введения в организм самки крыс на 7, 8 и 9 дни беременности, в период гастрюляции. Морфологических нарушений плодов не было обнаружено. Также нет усиления постимплантационной гибели, что указывает на то, что увеличение веса плодов не есть результат компенсаторного роста. Сходные результаты трансплантации различных типов клеток указывают на общий механизм стимуляции роста плодов. Возможно, что результат развивается из-за стимуляции функции децидуальных клеток.

ИССЛЕДОВАНИЕ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СВОЙСТВ И БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ МЕМБРАННЫХ ВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК *IN VIVO*

Неустроева О.А., Гомзикова М.О.* , Аймалетдинов А.М., Бондарь О.В.,
Старостина И.Г., Клетухина С.К., Курбангалеева С.В., Ризванов А.А.

Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский Федеральный
Университет, Казань, Россия

*marina.gomzikova.gmo@gmail.com

Введение. Основной характеристикой мезенхимных стволовых клеток (МСК), в виду которой они зачастую рассматриваются в качестве привлекательного терапевтического инструмента, является низкая экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости второго типа (ГКС II) и полное отсутствие молекул главного комплекса гистосовместимости первого типа (ГКС I). Благодаря такому свойству, а также их недифференцированному состоянию, внутривенная инъекция аутологичных МСК не вызывает иммунного ответа. Более того, показано, что МСК проявляют иммуносупрессивную и противовоспалительную активности. В свою очередь, микровезикулы (МВ) стволовых клеток демонстрируют биологическую активность и иммунологические свойства родительских клеток. В отличие от МСК, которые имеют предрасположенность к неограниченному клеточному росту и формированию опухолей, МВ являются наиболее безопасным терапевтическим инструментом, подходящим для крупномасштабного производства, удобным для хранения и использования в клинике. В связи с актуальностью данного вопроса, мы исследовали иммуногенность аллогенных МВ, индуцированных цитохлазином В, и их биораспределение *in vivo*.

Материалы и методы. Стволовые клетки и мембранные везикулы, индуцированные цитохлазином В (МВ-ЦВ), были получены из жировой ткани мышей (*Mus musculus*, СВА×С57В1/6). Титр антител против эритроцитов барана в присутствии МСК и МВ-ЦВ был оценен с помощью теста гемагглютинации. Аллогенные МВ-ЦВ, предварительно окрашенные мембранным красителем DiD, вводили в животных подкожно и внутримышечно в двух разных концентрациях 1мг/мл и 0,5 мг/мл. Флуоресцентный сигнал детектировали *in vivo* при помощи IVIS Spectrum (PerkinElmer, USA).

Результаты. В результате иммунизации было обнаружено, что титр антител против эритроцитов барана в сыворотке крови мышей, которые предварительно получили внутривенную инъекцию 75×10^3 аллогенных МСК или 15 мкг МВ-ЦВ был в 1,5 и 1,7 раз меньше, соответственно, чем в сыворотке интактных мышей (получивших предварительную инъекцию только фосфатно-солевого буфера). При

подкожном введении 0,5 мг/мл МВ-ЦВ интенсивность флуоресцентного сигнала составляла 2.705 о.е.ф, а при введении удвоенной дозы - 5.534 о.е.ф. (через 1 час). Флуоресцентный сигнал сохранялся через 1 час, 48 часов, и 14 дней после инъекции, как при подкожном, так и при внутримышечном введении. При помощи 3D-моделирования было установлено, что подкожная инъекция локализовалась близко к поверхности кожи, в то время как флуоресцентный сигнал от внутримышечного введения детектировался на разных фокусных расстояниях, что говорит о распространении МВ-ЦВ по ткани.

Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) Федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ КЛЕТОК ПУПОВИННОЙ КРОВИ

Оспанова М.Е., Буркитбаев Ж.К., Балтабаева Т.С., Савчук Т.Н., Аймырзаева М.К.*

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения
«Научно-производственный центр трансфузиологии» Министерства
здравоохранения Республики Казахстан, Астана, Казахстан
*omnipct16@mail.ru

Введение. Пуповинная кровь (ПК) содержит множественные популяции ES-подобных и других плюрипотенциальных клеток, способных приводить к возникновению гемопоэтических, эпителиальных, эндотелиальных и нервных тканей как *in vitro*, так и *in vivo*.

Цель: изучение морфофункциональных и физиологических свойств мезенхимальных стволовых клеток (МСК) ПК.

Материалы и методы. Исследованы 15 образцов ПК, полученные после рождения ребенка, когда плацента еще в полости матки. Использованы 2 метода: ручной и автоматический. Для анализа экспрессии поверхностных антигенов в ПК и культуре МСК применялся метод проточной цитофлуориметрии. Культивировали инкубированием адгезионной культуры клеток в MEM средах с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и в условиях гипоксии.

Результаты исследования. ПК получали с соблюдением принципов медицинской биоэтики у доношенных новорожденных (38–40 недель гестации). Из 15 новорожденных 5 родились в результате первых родов, 7 - вторых, 3 - третьих. Вес варьировался от 3130 г. до 4350 г. К процессингу были допущены дозы ПК с общим весом более 120 гр., с содержанием ядродержащих клеток (ЯСК₁) более $0,40 \cdot 10^9$ клеток в дозе, с отрицательными результатами тестирования на трансфузионные инфекции и бактериальную контаминацию.

При оценке чистой объем ПК и ЯСК до процессинга составил у первородящих от 65 мл до 121 мл, ЯСК в пределах $8,6 - 18,9 \cdot 10^9$ в дозе, при вторых и третьих родах - 55 - 98,5 мл, ЯСК - $5,55 - 13,6 \cdot 10^9$ в дозе.

В каждом образце ПК проведено HLA-типирование, иммунологические и молекулярные исследования. После процессинга выявлены следующие показатели CD34-позитивных клеток: у первородящих CD34+ $2,33 - 6,24 \cdot 10^6$ в дозе; при вторых и третьих CD34+ $0,43 - 4,51 \cdot 10^6$ в дозе.

С помощью проточной цитофлуориметрии поверхностные маркеры CD73+, CD90+, CD45+, CD34+, CD105+, CD16+, CD117+ изучены сразу после выделения и после культивирования. Экспрессия маркеров CD73+, CD90+, CD105+, изначально была высокой - от 85,7% до 99,4% и практически не

изменялась в процессе культивирования. Экспрессия CD34⁺ менялась в процессе культивирования от первоначальных значений 1,5% до 7,0%. Маркер CD45⁺ не менялся. Маркеры CD16⁺, CD117⁺, значения которых изначально находились в пределах 1,7-2,6% и 4,4-8,4% и в ходе процессов культивирования их экспрессия уменьшилась.

Повторный анализ экспрессии поверхностных антигенов после культивирования МСК ПК показал, что они экспрессируют HLA-класс I и не экспрессируют HLA-класс II.

Заключение. Показатели ПК взаимосвязаны со многими факторами, включая течение беременности, параметры новорожденных, способы получения и процессинга. ПК экспрессирует целый ряд маркеров, содержание которых дифференцированно меняется в результате культивирования.

В ходе исследования будет продолжена работа по детальной оценке иммунофенотипической характеристики клеток-предшественников в образцах ПК.

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ ФАРМАКОТЕРАПИИ НА КЛЕТОЧНУЮ СОСТАВЛЯЮЩУЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ПРИ ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ОФТАЛЬМОХИРУРГИИ

Переpletчикова Д.А.^{1,2*}, Машель Т.В.^{1,2}, Писугина Г.А.², Хорольская Ю.И.²,
Александрова О.И.²

1. ФGAOY BO CПБПУ Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия.

2. ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия.

*dasha_perepletch@mail.ru

Васкуляризованные бельма роговицы зачастую являются следствием заболеваний глаз, связанных с недостаточностью лимбальных стволовых клеток. Одним из перспективных способов лечения данной патологии является трансплантация стволовых клеток на различных типах скаффолдов, которая всегда сопровождается фармакотерапией. Правильный подбор офтальмологических препаратов позволит минимизировать риски возникновения побочных эффектов, вызванных цитотоксическим действием препарата на клеточную составляющую тканеинженерных конструкций, тем самым, повысив вероятность успешной зрительной реабилитации.

Цель данной работы состояла в исследовании возможности использования клеточных тест-систем для оценки влияния фармакотерапии на клеточный компонент тканеинженерных конструкций.

В настоящей работе использовались коммерческие препараты, выпущенные в форме глазных капель, относящиеся к группам: анестетики, антисептики, антибиотики и глюкокортикостероиды.

В качестве тест-системы были выбраны лимбальные стволовые клетки (ЛСК), наиболее часто используемые для создания биомедицинского клеточного продукта.

Токсичность препаратов, применяемых в офтальмохирургии, в отношении клеточных тест-систем оценивали по морфологии, пролиферации и метаболической активности клеток с помощью световой микроскопии, МТТ-теста и системы клеточного анализа xCELLigence.

В ходе исследования было выявлено, что внутри фармакологических групп препараты различаются по степени и характеру токсичности. Это позволяет косвенно прогнозировать, что неправильно подобранный препарат или его концентрация могут привести к гибели трансплантированных клеток и заметно снизить эффективность репаративных процессов.

Дальнейшие исследования в этой области позволят осуществить подбор наиболее оптимально сочетающихся препаратов, применяемых в офтальмохирургии.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ 14-50-00068.

MEGAKARYOCYTE DIFFERENTIATION OF CORD BLOOD CD34⁺ CELLS IN CO-CULTURE WITH BONE MARROW MESENCHYMAL STROMAL CELLS OR CORD BLOOD ENDOTHELIAL CELLS *IN VITRO*

Pilyutina O. Y., Vasina E.V., Goncharova N.V., Petyovka N.V.*

National Research Center of Transfusiology and Medical Biotechnologies, Minsk, Belarus

*npet@blood.by

Objective: to study megakaryocyte differentiation of cord blood CD34⁺ cells in co-culture with bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC) or cord blood progenitor endothelial cells (EC) stimulated with cytokine cocktails *in vitro*.

Material and Methods. CD34⁺ cells isolated from umbilical cord blood mononuclear cells using immunomagnetic bead selection. The CD34⁺ cells were cultured in serum-free StemSpan medium supplemented with 1% of human plasma and cytokine cocktails for 13 days. Cells were cultivated for 7 days in liquid culture. Then cells were transferred to the EC or MSC monolayer.

Results. The influence of cytokines - stem cell factor (SCF), thrombopoietin (TPO), tyrosine kinase 3 ligand (Flt-3L), interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11 - in the presence of bone marrow MSC or umbilical cord blood EC on the expansion and megakaryocytic differentiation of CD34⁺ cells are studied. The replacement of Flt-3L by IL-3 in growth factor cocktails SCF, TPO, IL-6/IL-11 increase in total nuclear cells during megakaryocytic differentiation both without the use of supporting cells or in coculture ($p = 0,04$, t-test). The replacement of IL-6 by IL-11 does not result in expansion of CD45⁺ cells ($p=0,07$), but increases expansion of the megakaryocytic progenitors ($p=0,04$). Co-cultivation with MSC promotes an increase in quantity of CD45⁺ cells ($p = 0,01$) and early CD41⁺ megakaryocytic progenitors ($p=0,04$) compared to similar co-culture with EC or liquid culture. CD41⁺CD42⁻ megakaryocytic progenitors attach to MSC, whereas more mature CD41⁺CD42⁺ cells attach to EC. The most effective cytokine cocktail consists of SCF, TPO, IL-3, IL-6 in co-culture with MSC and gives rise to 65 CD41⁺ cells per CD34⁺ cell.

This research was funded by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research grant No. B17-124

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ *IN VITRO* И ХАРАКТЕРИСТИКА СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИМБА ЧЕЛОВЕКА И КРОЛИКА

Писугина Г.А.^{1,2*}, Александрова О.И.¹, Хорольская Ю.И.¹, Журенков К.Э.^{1,2}, Машель Т.В.^{1,3}, Переплетчикова Д.А.^{1,3}, Зенин В.В.¹, Карпович В.В.⁴, Гаврилюк И.О.⁴, Блинова М.И.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

3. ФГАОУ ВО Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

4. ФГБОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, Санкт-Петербург, Россия

*pga120794@gmail.com

В настоящее время одной из актуальных задач регенеративной офтальмологии является разработка клеточно-тканевых конструкций для лечения синдрома лимбальной недостаточности (ЛН). Наиболее подходящим источником клеточного компонента для таких конструкций являются стволовые клетки лимба (ЛСК). Разработанные на сегодняшний день способы выделения, культивирования и трансплантации ЛСК имеют свои достоинства и недостатки.

Наша работа направлена на поиск оптимального источника стволовых клеток для исследования возможности использования при лечении глазных патологий. В ходе работы были введены в культуру *in vitro* и охарактеризованы ЛСК человека и кролика.

В качестве источника клеток использовали фрагменты лимба кадаверных глаз человека и цельных энуклеированных глаз здоровых кроликов породы Шиншилла. Клетки выделяли миграционным и ферментативным способами. Для ферментативного метода использовали Dispase II (Roche, Германия), коллагеназу краба (БиолоТ, Россия) и Trypsin-EDTA (Invitrogen, США). Культивирование проводили в питательной среде DMEM/F12 (Gibco, США) при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Исследовали возможность длительного культивирования. Характеристику полученной популяции клеток по основным стволовым маркерам и маркерам дифференцировки проводили методами иммуноцитохимии и цитофлуометрии. В качестве контроля использовали ММСК костного мозга, а также постоянные клеточные линии роговицы человека (HCEC) и кролика (SIRC).

Ферментативный и миграционный методы показали высокую результативность: с помощью обоих методов удалось получить достаточное для введения в культуру *in vitro* количество жизнеспособных клеток. До 1-го пассажа

полученная популяция была представлена как эпителиоподобными, так и МСК-подобными клетками. После 2 пассажа преобладали клетки МСК-подобной формы. Данные иммуноцитохимии и цитофлуометрии выявили, что полученная культура экспрессирует маркеры ММСК, установленные международным комитетом по идентификации ММСК [Domínguez M. et al., 2006], однако отличается от ММСК по уровню экспрессии маркеров дифференцировки (СК 3/12, СК 19), что может указывать на их источник происхождения и возможность использования как оптимального компонента клеточно-инженерных конструкций для лечения ЛН.

Работа выполнена в рамках гранта РФФ 14-50-00068.

EFFECT OF CYCLOPHOSPHAMIDE ON EXCITATION WAVE PROPAGATION IN HUMAN iPSC-DERIVED CARDIOMYOCYTES MONOLAYER

Podgurskaya A.D.^{1*}, Tselaya V.A.¹, Slotvitsky M.M.¹, Demyteva E.V.², Valetdinova K.R.², Agladze K.I.¹

1. *Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia*

2. *The Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia*

**alisapodgurskaya@mail.ru*

The cardiotoxicity of anticancer therapy is one of the life-threatening complications. In the last forty years, this topic was associated mostly with anthracyclines. However, the other classes of anticancer drugs (topoisomerase inhibitors, alkylating agents, microtubule-targeting drugs and others) could develop serious heart disorders and arrhythmias. One of the most effective and safe medicines, cyclophosphamide is associated with heart block, tachyarrhythmias, congestive heart failure, hemorrhagic myopericarditis when taken in high doses (100-200 mg/kg). Nevertheless, the data of its application at low doses as well as its influence on ion channels are rare. The mechanism of its action in producing arrhythmias is not fully understood. In this study monolayer of human iPSC-derived cardiomyocytes (CM) and neonatal rat ventricular myocyte (NRVM) monolayers were used to examine conduction velocity (CV) and maximum capture rates after application 213-2130 μM of cyclophosphamide by the optical mapping method. In NRVM monolayer maximum capture rate and CV decreased on 14% and 11% respectively at relatively low concentrations (213 μM) of the drug. In experiments on human iPSC-derived CM the minimal effect was reached at 639 μM of the drug and manifested in 25% maximal capture rate decrease. Stabilization of the CV and maximum capture rate was obtained after 15 min after applying cyclophosphamide. Re-entry formation took place at 2.5 Hz in control vs 1.6 Hz at 639 μM cyclophosphamide. Reduction of maximum capture rate in CM monolayers may lead to the conclusion of the refractoriness period lengthening under relatively low concentrations of cyclophosphamide. Cases of re-entry emerge under increasing external stimuli may help to understand the possible mechanisms of provoking an arrhythmia after acute exposure of cyclophosphamide on human CM.

АНАЛИЗ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МСК ЧЕЛОВЕКА, ИНДУЦИРОВАННОЙ НАНОЧАСТИЦАМИ ДИОКСИДА ЦЕРИЯ

Попов А.Л.^{1*}, Ермаков А.М.¹, Савинцева И.В., Селезнева И.И.¹, Иванов В.К.²

1. ИТЭБ РАН, Пущино, Россия

2. ИОНХ РАН им. Н.С. Курнакова, Москва, Россия

*antonpopovleonid@gmail.com

На сегодняшний день для ускорения пролиферации мезенхимальных стволовых клеток (МСК) человека в культуре и поддержания их статуса стволовости используются дорогостоящие ростовые факторы и добавки, что, в конечном счете, увеличивает стоимость терапии с использованием МСК. В связи с этим поиск новых недорогих стимуляторов пролиферации МСК, обеспечивающих сохранение их нативных характеристик, является актуальной задачей.

Современный уровень развития нанотехнологий позволяет получать новые полифункциональные материалы, обладающие уникальными физико-химическими свойствами. Одним из наиболее перспективных материалов для биомедицинских целей является нанокристаллический диоксид церия (CeO_2), обладающий низкой токсичностью и уникальными редокс-свойствами. На культуре МСК человека, выделенных из пульпы зуба, показано, что наночастицы CeO_2 (3-8 нм) стимулируют пролиферацию МСК в дозозависимой манере. Анализ уровня экспрессии 96 ключевых генов, ответственных за пролиферацию, поддержание стволовости (Notch и Wnt-сигналинг), клеточный цикл и дифференцировку показал активацию нескольких групп генов, ответственных за пролиферацию, миграцию (AXIN, MSX1, EGFR, FGFR1, JAG1, NOTCH1, RB1, TERT, CDC6, WEE1, CCNA2, AURKB, CCNB2) и снижение уровня транскриптов мРНК генов, ответственных за апоптоз и некроз. Таким образом, можно сделать вывод о том, что наночастицы церия могут активировать пролиферативную активность МСК человека, модулируя уровень внутриклеточных АФК и экспрессию генов. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что наночастицы CeO_2 могут быть использованы как специальная культуральная добавка для стимуляции пролиферации МСК или в качестве одной из составляющих скаффолдов для их культивирования.

Работа выполнена при поддержке совместного гранта РФФИ и Правительства Московской области № 17-44-500718.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ - МАРКЕРОВ ОСТЕОГЕННОЙ И ХОНДРОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРИ РЕЦЕССИВНОЙ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЭПИФИЗАРНОЙ ДИСПАЗИИ

Рюмина Н.А.^{1*}, Котелевская Е.А.^{1,2}, Багаева В.В.^{1,2}, Кенис В.М.⁴, Енукашвили Н.И.³

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

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

3. ФГБУ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

4. НИДОИ им Г.И. Турнера, Санкт-Петербург, Россия

*nadiy007@ya.ru

Введение. Аутосомно-рецессивная множественная эпифизарная дисплазия (или рМЭД) – заболевание, характеризующееся аномальным развитием костей и хрящей эпифизов, деформацией стоп и удвоенными надколенниками, и рассматривающееся как умеренно выраженный вариант диастрофической дисплазии. Данное заболевание вызвано мутациями в гене *SLC26A2*, кодирующем трансмембранный белок сульфат-транспортер, транспортирующий неорганический сульфат-ион (SO₄²⁻) внутрь хондроцитов, нуждающихся в высокой концентрации данного элемента для сульфонирования хондроитинпротеогликанов. При рМЭД нарушается дифференцировка МСК в хондроциты и остециты. Существует предположение, что для рМЭД возможно медикаментозное симптоматическое и направленное на устранение причины заболевания лечение, основанное на серосодержащих препаратах. Для создания такого лечения рМЭД необходимо разработать модель для оценки его эффективности.

Цель исследования: разработать методику оценки состояния биологических тест-моделей, предназначенных для исследования биопрепаратов-корректоров рМЭД.

Материалы и методы. Основным материалом исследования являлась РНК, полученная из образцов МСК жировой ткани, хондроцитов и остецитов здоровых доноров и пациентов с рМЭД. Методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру был подтвержден диагноз рМЭД у пациентов. Методика оценки экспрессии генов-маркёров остеогенной и хондрогенной дифференцировки МСК жировой ткани была разработана на основе ПЦР «в реальном времени». С целью подбора праймеров для постановки ПЦР в реальном времени были выбраны следующие 4 гена-маркера остеогенной и хондрогенной дифференцировки МСК: *TWIST1*, *BGLAP*, *CBFA1* и *COL2A1*. В качестве референсного гена для анализа экспрессии исследуемых генов-маркеров был выбран ген «домашнего хозяйства» *GAPDH*. Относительный уровень экспрессии

генов-маркеров рассчитывали как $2^{-\Delta\Delta C_e}$. Для оценки различий между двумя независимыми выборками (волонтерами и пациентами) был использован U-критерий Манна-Уитни.

Результаты. Показано, что у пациентов с рМЭД экспрессия маркёров остеогенной и хондрогенной дифференцировки была снижена на 50 % и более по сравнению со здоровыми донорами. С помощью разработанной методики были выявлены различия *in vitro* в протекании остеогенной и хондрогенной дифференцировки МСК у здоровых доноров и пациентов с подтвержденным диагнозом рМЭД, из чего следует, что данная методика пригодна для оценки состояния биологических тест-моделей, предназначенных для исследования биопрепаратов-корректоров рМЭД.

Вывод. Таким образом, была проведена разработка и апробация относительно экономичной и не трудоемкой методики оценки состояния биологических тест-моделей, предназначенных для исследования биопрепаратов-корректоров рМЭД. Данная методика в дальнейшем может быть применена для подбора медикаментозного лечения симптомов рМЭД и оценки эффективности действия выбранного препарата. Однако для введения разработанной методики в медицинскую практику необходимо провести её дальнейшую валидацию.

РОЛЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В ИНДУКЦИИ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА

Семенова Д.С.^{1,2*}, Костина А.С.¹, Малашичева А.Б.^{1,2}

1. Национальный медицинский исследовательский центр им. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

*daria.semenova1994@gmail.com

Нарушение работы сигнального пути Notch вовлечено в развитие множества патологий сердечно-сосудистой системы, в частности кальцификации аортального клапана. Роль дисрегуляции Notch в процессах кальцификации аортального клапана была показана во многих недавних исследованиях. Эндотелиальные клетки определяют дифференцировочный статус подлежащих клеток мезенхимного происхождения в стенках сосуда посредством Notch сигналинга. Целью данной работы было выяснить, способны ли эндотелиальные клетки клапана опосредовать остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана.

Интерстициальные и эндотелиальные клетки получали из аортальных клапанов пациентов, оперированных по поводу аортального стеноза. Остеогенную дифференцировку запускали при помощи специфических индукторов. Оценку дифференцировки проводили путем окраски культур клеток, а также при помощи анализа экспрессии маркеров остеогенной дифференцировки методом количественной ПЦР. Для изучения межклеточных взаимодействий интерстициальные клетки сокультивировали с эндотелиальными клетками клапана. Активацию сигнального пути Notch проводили путем введения в клетки на лентивирусном носителе активированного домена Notch1.

Сокультивирование интерстициальных клеток с эндотелиальными повышало степень кальцификации клеток в зависимости от дозы эндотелия. Индукция сигнального пути Notch приводила к усилению остеогенной дифференцировки интерстициальных клеток. Сокультивирование эндотелиальных и интерстициальных клеток приводило к активации Notch, а также к индукции генов остеодифференцировки. Полученные результаты подтверждают совместное участие интерстициальных и эндотелиальных клеток в кальцификации клапана аорты, а также позволяют сделать вывод о том, что уровень активации Notch играет важную роль в кальцификации клеток аортального клапана.

Исследование поддержано грантом РФФИ мол_а 18-34-00277.

ДОЗАЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ВОСПАЛЕНИЯ НА ИНДУЦИРОВАНИЕ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК В СОСУДИСТОМ СПЛЕТЕНИИ МОЗГА КРЫС

Сергеев В.Г.^{1,2*}, Сергеева Т.Н.¹

1. *ФГБОУ ВО Удмуртский государственный университет, Ижевск, Россия.*
 2. *ФГБОУ ВО Ижевская государственная медицинская академия, Ижевск, Россия.*
- *cellbio@ya.ru

Использование нейральных стволовых клеток (НСК) в регенеративной медицине ограничено тем, что эти клетки у взрослых млекопитающих локализованы в отдельных, небольших и труднодоступных зонах ЦНС. В этой связи представляется перспективным использование в качестве источника аутологичных нейрогенных клеток хирургически доступных сосудистых сплетений мозга. Эти структуры имеют вид ворсинчатых образований в просвете желудочков головного мозга, представляют собой сосудисто – эпителиальное производное мягкой мозговой оболочки, вырабатывающее цереброспинальную жидкость. В нашей работе мы исследовали влияние воспаления различной интенсивности на индуцирование пролиферации НСК в сосудистом сплетении латеральных желудочков мозга крыс. Воспаление моделировали интраперитонеальным введением бактериального эндотоксина (липополисахарида *E.coli*) в концентрации 1 мкг/кг веса (малая доза) и 50 мкг/кг веса (большая доза). При помощи иммуногистохимического метода на криостатных срезах мозга исследовали локализацию и количество клеток экспрессирующих нестин и белок, ассоциированный с микротрубочками (MAP2). Через 2 дня после введения малой дозы липополисахарида в сосудистых сплетениях отмечалось достоверное увеличение количества клеток, иммунопозитивных к нестину и MAP-2, тогда как большая доза редуцировала количество клеток, экспрессирующих эти маркеры нейрогенеза. Гистотопография нестинэкспрессирующих клеток свидетельствовала об интенсификации в условиях эндотоксиновой стимуляции малой интенсивности миграционной активности нейральных предшественников из сосудистого сплетения в подэпендимальный слой субвентрикулярной зоны мозга. Таким образом, обнаружено наличие в составе эпителиальных клеток сосудистого сплетения мозга крыс нейральных стволовых клеток, количество и миграционная активность которых в паренхиме мозга увеличивается под действием факторов, образуемых в условиях воспаления низкой интенсивности.

Исследование поддержано грантом РФФИ 18-015-00177а.

КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИАМИДА И ПОЛИПИРРОЛА ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ

Смирнова Н.В.^{1,2*}, Сапурина И.Ю.¹, Колбе К.А.², Шабунин А.С.², Юдин В.Е.^{1,2}

1. Институт высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

* nvsmirnoff@yandex.ru

Электропроводящие полимеры (ЭП) представляют собой органические высокомолекулярные соединения, обладающие полупроводниковыми свойствами. К наиболее изученным ЭП относятся полианилин, полиацетилен, полипиррол, политиофен, полифенилен, полифениленвинилен. Современными исследованиями обоснована возможность применения ЭП в широком спектре биомедицинских технологий, к которым относится разработка систем доставки лекарственных препаратов, конструирование биосенсорных систем и биосовместимых электродов для применения *in vivo* и *in vitro*. Продемонстрирована возможность применения ЭП для создания биоактивных матриц, предназначенных для тканевой инженерии.

Наиболее перспективным в контексте биомедицинского использования является полипиррол (РРy). РРy обладает рядом свойств, которые делают его перспективной основой для создания «умных» биоактивных материалов. РРy обычно используют в составе композитных материалов, где второй компонент обеспечивают необходимые механические свойства материала (прочность, гибкость), отсутствующие у РРy.

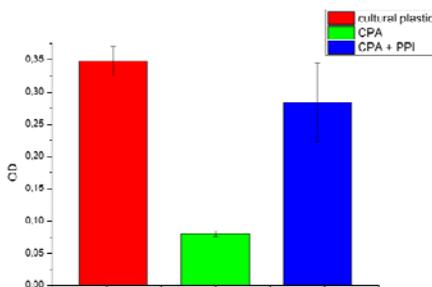
В данном исследовании для достижения лучших механических свойств матриц использовали полиамид. Из раствора полиамида методом электроспиннинга получали матрицы, имеющие структуру волокнистого нетканого материала. Путем окислительной полимеризации пиррола был синтезирован РРy, который ассоциировался с сополиамидными (СПА) волокнами композитной матрицы (рис.1).



Рисунок 1. Композитная матрица из нетканного волокнистого материала на основе CPA, волокна покрыты агрегатами PPy (б).

С использованием культуры дермальных фибробластов человека было показано, что включение в состав композита PPy не вызывает цитотоксического действия на культуру клеток. Кроме того, в сравнении с нетканым материалом из CPA, композитные матрицы на основе CPA и PPy лучше поддерживают адгезию и пролиферацию фибробластов (рис. 2).

Рисунок 2. Оценка цитотоксического и регулирующего пролиферативную активность действия PPy на культуру дермальных фибробластов человека.



Представлены данные МТТ теста; оптическая плотность раствора в лунках без матрицы, в лунках с образцом матрицы из сополиамида, с образцом композитной матрицы из сополиамида и PPy.

Вероятно, что адгезии и пролиферации фибробластов способствует адсорбция на PPy белков сыворотки крови, используемой для культивирования клеток.

ЗАМЕНА КОСТНОГО МОЗГА КАК СПОСОБ УСИЛЕНИЯ СИНТЕЗА ДИСТРОФИНА МЫШЕЙ MDX

Соколова А.В.^{1*}, Тимонина Н.А.², Кравцова В.В.², Кривой И.И.², Михайлов В.М.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. Кафедра общей физиологии СПбГУ, Санкт-Петербург, Россия

*avsokolova@inbox.ru

Мутантные мыши mdx - лабораторная модель миодистрофии Дюшенна, вызываемой мутацией в гене белка дистрофина. Показано, что трансплантация клеток нормального костного мозга после облучения мышей mdx летальными дозами лучей Рентгена спасает животных от гибели, однако, синтез дистрофина не восстанавливается (Wernig *et al.*, 2005). Для преодоления блокады синтеза дистрофина нами была использована трансплантация сингенных клеток костного мозга (ККМ) мышей C57BL/6 мышам mdx, облученных лучами Рентгена в немиэлоаблативной дозе 3 Гр (Соколова и др., 2010; 2016). В течение годового эксперимента иммуноморфологически было установлено, что у химер mdx доля дистрофин-положительных поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ) в бедренной мышце возрастает с $1.1 \pm 0.4\%$ в контроле до $27.6 \pm 6.7\%$ на 6 месяце после трансплантации и понижается до $5.1 \pm 1.1\%$ на 12 месяце. При этом гибель ППМВ уменьшается от $2.2 \pm 0.6\%$ в контроле до $0.5 \pm 0.1\%$ в конце года после трансплантации, что указывает на усиление выживаемости ППМВ мышей mdx после замены ККМ. Доля ППМВ без центральных ядер, как показатель успеха терапии, растет до середины года после трансплантации от $10.5 \pm 1.0\%$ до $22.6 \pm 1.9\%$, уменьшаясь к концу года до $10.7 \pm 1.2\%$. Аналогичные изменения синтеза дистрофина наблюдались в диафрагме химер mdx. Кроме того, у химер mdx наблюдалось возрастание доли нейромышечных соединений (НМС), состоящих из кластеров ацетилхолиновых рецепторов, имеющих форму «ветвей», характерных для нормальных мышей C57BL с $14.1 \pm 3.2\%$ в контроле до $42.6 \pm 5.7\%$, $49.1 \pm 2.1\%$, $48.4 \pm 5.1\%$ и до $37.4 \pm 2.7\%$ на 4, 8, 11 и 12 месяцах после трансплантации у химер mdx, что указывает на восстановление структуры НМС. По данным кафедры физиологии СПбГУ улучшение структуры НМС у химер mdx через 4 месяца после трансплантации сопровождалось восстановлением потенциала покоя и локальной гиперполяризации концевой пластинки НМС до уровня контрольных животных C57BL (Кравцова и др., 2011).

Таким образом, на мышах mdx удалось частично восстановить синтез дистрофина при помощи замены мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа после немиэлоаблативного рентгеновского облучения. Восстановление синтеза дистрофина влекло за собой улучшение морфологии ППМВ и восстановление структуры и электро-физиологических свойств НМС.

ВЛИЯНИЕ HMGB1/2 ХРОМОСОМНЫХ БЕЛКОВ НА ПРОЦЕСС ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК

Старкова Т.Ю.^{1*}, Томилин А.Н.^{1, 2}

1. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской Академии Наук, Санкт-Петербург, Россия

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

*t.starkova@incras.ru

Негистоновые белки HMGB1 и HMGB2 являются одними из ключевых структурно-регуляторных ядерных белков, принимающих участие, как в организации структуры хроматина, так и в регуляции основных генетических процессов клетки, таких как транскрипция и репарация ДНК. Степень окислительно-восстановительного состояния, наличие посттрансляционных модификаций и уровень экспрессии данных белков в ядре клетки, согласно литературным данным, могут оказывать влияние на пролиферацию и дифференцировку ЭСК.

Целью данной работы является исследование индивидуальной и совместной роли HMGB1/2 в процессах дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши.

Согласно нашим данным, CRISPR/Cas9-опосредованный нокаут генов HMGB1 и HMGB2 приводит к изменениям (увеличению и уменьшению) скорости пролиферации HMGB1^{-/-} и HMGB1^{-/-};HMGB2^{-/-} ЭСК соответственно. В случае HMGB1^{-/-};HMGB2^{-/-} ЭСК характерно снижение уровня экспрессии Nanog по сравнению с клетками дикого типа. Нами показано, что обе делеции не оказывают влияние на способность ЭСК E14 дифференцироваться в EpiLCs (от англ. epiblast-like cells) и EpiSCs (epiblast stem cells) клетки, однако наблюдается некоторая задержка дифференцировки из HMGB1^{-/-};HMGB2^{-/-} EpiLCs в EpiSCs по сравнению с клетками дикого типа.

Гистологический анализ тератом, полученных после введения подкожно нокаутных по HMGB1 и HMGB2 ЭСК мышам линии NUDE, свидетельствует о том, что HMGB1^{-/-} и HMGB1^{-/-};HMGB2^{-/-} ЭСК не обладают способностью дифференцироваться в клетки эндодермы. В докладе также будут представлены данные направленной дифференцировки HMGB1^{-/-} и HMGB1^{-/-};HMGB2^{-/-} ЭСК из EpiLCs в клетки нейроэктодермы и эндодермы *in vitro*.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (18-04-01199) и РНФ (14-50-00068).

СОДЕРЖАНИЕ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ (CD34, CD133) КЛЕТОК В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ АЛКОГОЛЬНЫМ ФИБРОЗОМ ПЕЧЕНИ

Такунова К.И., Газатова Н.Д., Юрова К.А., Вульф М.А., Литвинова Л.С.*

Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия

**larisalitinova@yandex.ru*

Фиброгенез печени, индуцированный гепатотоксическими факторами, в т.ч. этанолом, характеризуется цикличностью процессов повреждения/восстановления печеночной паренхимы. Мобилизация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) из костного мозга в циркуляцию и их миграция в очаг деструкции, являются адаптивной реакцией организма, развивающейся в ответ на повреждение органов и тканей.

В исследование были включены 62 больных алкогольным фиброзом печени (АФП, МКБ 10 - K70.2); 15 пациентов, злоупотребляющих алкоголем без фиброза печени и 20 условно здоровых доноров. Число ГСК (CD45, CD34, CD133) в образцах периферической крови определяли методом проточной цитометрии.

Содержание CD45⁺CD34⁺/CD133⁺ клеток в образцах периферической крови пациентов с АФП на начальных и умеренных стадиях фиброза, значимо превышало контрольные цифры, в среднем в 2,5 раза ($p < 0,05$), а также показатели группы сравнения (\approx в 1,4 раза). У больных АФП на терминальных стадиях фиброза число CD34⁺ - и CD133⁺ - клеток в образцах периферической крови значимо снижалось относительно результатов контроля и группы сравнения. Мы предполагаем, что повышенные уровни CD34 и CD133 клеток в периферической крови больных АФП на начальных стадиях фиброза связаны с персистирующим воспалением в паренхиме печени и дисбалансом между процессами ее повреждения и эндогенными репаративными возможностями. Установлено, что часть CD34 клеток, обнаруживаемых в печени, являются гемопоэтическими и принимают участие в ее регенерации. С другой стороны, снижение количества CD34 и CD133 клеток в циркуляции на терминальных стадиях фиброза у обследованных нами пациентов с АФП, может свидетельствовать о нарастающей декомпенсации и истощении регенераторного потенциала организма на финальных стадиях дегенеративного процесса. Оценка содержания CD34- и CD133-позитивных клеток в периферической крови может быть использована как важный прогностический критерий, свидетельствующий о регенеративной активности организма в ответ на повреждение печеночной паренхимы.

COMPARATIVE ANALYSIS OF ELECTROPHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS IN VENTRICULAR CARDIOMYOCYTES OBTAINED FROM A HEALTHY INDIVIDUAL AND A PATIENT WITH THE SYNDROME OF AN ELONGATED QT INTERVAL

Frolova S.R.*, Syunyaev R.A., Agladze K.I.

*Moscow Institute of Physics and Technology, MIPT, Dolgoprudny, Russia
isheydi02@gmail.com*

Abstract. Despite a relatively high prevalence of hereditary LQTS, to which it is necessary to add both hereditary and induced LQTS as well as the ease of detection on the ECG, the mechanism of reentry formation in this syndrome is still unknown. In order to create an experimental model of LQTS in our work, the iPSc of a patient-specific line from a healthy patient (line ISMA 6L) and from a patient with LQT syndrome (line If 31-5) was differentiated into a cardiac cells and the voltage - dependent ion currents of these cells were compared in this study.

Methods. Voltage-dependent ion currents were recorded in single isolated cardiomyocytes by the perforated patch-clamp method in a whole-cell configuration.

Results. APD in the cardiac cells obtained from the healthy individuals is 400 ms and APD in the cardiac cells carrying the mutation is 600 ms. I_{Na_v} and $I_{Ca, L-type}$ are similar in both lines of cardiac cells. I_{Kr} was isolated as an E-4031-sensitive current. An E-4031-sensitive current was present in all the cardiomyocytes that were studied in the cells obtained from the healthy individuals. But the I_{Kr} is absent in the cardiomyocytes obtained from a patient with LQT syndrome. This explains the elongation of APD of cardiomyocytes obtained from the line If 31-5 line in comparison with the APD of cardiomyocytes from the ISMA 6L line.

Conclusions. We have detected the absence the I_{Kr} in a patient with LQT syndrome and therefore a difference in the action potential duration of the cardiomyocytes obtained from a patient-specific line from a healthy patient and from a patient with LQT syndrome. Using this data we are creating a mathematical model for varying conditions to lead to LQT syndrome.

This work was supported by Russian Sciences Foundation grant 18-71-10058.

ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧНОСТИ И ПРЕДЕЛА ОБНАРУЖЕНИЯ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ КОНТРОЛЯ МИКОПЛАЗМЕННОЙ КОНТАМИНАЦИИ КЛЕТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Чапленко А.А. *, Мельникова Е.В., Меркулова О.В., Рачинская О.А.

ФГБУ «НЦ ЭСМП» МЗ РФ, Москва, Россия

*chaplenko@expmed.ru

Основными источниками микоплазменной контаминации клеточных линий являются лабораторный персонал, технологическое оборудование, а также материалы, используемые в процессе производства клеточных продуктов. Таким образом, критическими контрольными точками микоплазменной контаминации являются входной контроль сырья и реактивов, а также контроль качества готовой продукции. Согласно EP 9.0 <2.6.7 Mycoplasmas> и USP41-NF36 <63. Mycoplasma tests>, к фармакопейным относятся два метода детекции *Mycoplasma spp.*: индикаторной клеточной культуры и культуральный метод, а минимальное детектируемое содержание микоплазм должно составлять не более 100 КОЕ/мл продукта.

Общие недостатки данных методов – трудоемкость и длительность проведения анализа, целесообразно рассмотреть варианты экспресс-анализа, например методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Время проведения полного анализа данными методами (от выделения нуклеиновых кислот до детекции) составляет 3-5 часов, возможна автоматизация большинства стадий анализа, оценка результатов проводится инструментально, минимизирован объем используемой для анализа пробы. Однако общей методологической проблемой для методов, использующих микроколичества (~10 µl) продукта является достижение необходимого уровня предела обнаружения (ПО). Для большинства разработанных ПЦР-систем, ПО в пробе объемом 10 мкл составляет не менее 10 копий, таким образом, с учетом вероятностного распределения аналита и потерь в ходе пробоподготовки, для образца объемом 1 мл ПО будет составлять ~500 КОЕ/мл, что не соответствует фармакопейным требованиям.

Предложенный нами подход – предварительное концентрирование образца путем центрифугирования в течение 10 минут при 12000 g с последующим отделением супернатанта. С целью дальнейшей очистки ДНК использовали набор «РИБОСОРБ», для амплификации и детекции – наборы «АмплиСенс» и «МИК-КОМ» (все -ИнтерЛабСервис, Россия).

Для подтверждения отсутствия ложноположительных результатов проводили анализ заведомо свободных от микоплазм клеточных линий с добавлением ОСО *E. coli* и *S. aureus* до концентрации 1000 КОЕ/мл. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что загрязнение пробы иными микроорганизмами не влияет на результат анализа.

С целью оценки предела обнаружения разрабатываемой методики проводили анализ заведомо свободных от микоплазм клеточных линий с добавлением ОСО *Mycoplasma arginini*, последовательным разбавлением получали концентрации от 10000 КОЕ/мл до 1 КОЕ/мл. Установлен предел обнаружения на уровне 10 КОЕ/мл образца, что удовлетворяет требованиям EP 9.0 и USP 41.

ПОВЫШЕНИЕ АЛЬФА1А-АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МЕЗЕНХИМНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЗА СЧЕТ ДЕЙСТВИЯ СЕРОТОНИНА

Чечехин В.И., Иванова А.М., В.И., Тюрин-Кузьмин П.А.

*Кафедра биохимии и молекулярной медицины, Факультета Фундаментальной Медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия.
v-chech@mail.ru

Мезенхимные стромальные клетки (МСК) выявляются в большинстве тканей организма и играют ключевую роль в процессах репарации, регенерации и поддержании гомеостаза. Функциональная активность МСК регулируется гормонами и нейромедиаторами, а одним из ключевых является норадреналин. Ранее мы показали, что при стимуляции сигнального пути бета-адренорецепторы/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ через 6 часов происходит повышение уровня экспрессии альфа1А-адренорецепторов и, как следствие, повышение чувствительности МСК к этому гормону.

Мы изучали, способны ли другие стимулирующие аденилатциклазу нейромедиаторы изменять чувствительность МСК к катехоламинам. Мы выбрали нейромедиаторы, рецепторы которых могут активировать аденилатциклазу, и методом ПЦР установили, что в МСК экспрессируются мРНК рецепторов аденозина (A2a, A2b), дофамина (DRD1, DRD5), гистамина (HRH2) и серотонина (HTR6, HTR7). Затем мы стимулировали ими МСК и через 6 часов анализировали их чувствительность к норадреналину и установили, что серотонин повышает число клеток, отвечающих на норадреналин. Гистамин, дофамин и аденозин - не изменяют. Путем вестерн-блоттинга мы также установили, что через 6 часов после преинкубации с серотонином в МСК повышается уровень экспрессии альфа1А-адренорецепторов. Кроме того, мы выяснили сигнальные механизмы гетерологической сенситизации и показали с помощью ингибиторного анализа и ИФА, что серотонин и норадреналин активируют аденилатциклазу, синтез цАМФ и протеинкиназу А. Нейромедиаторы, не вызывающие гетерологической сенситизации, ингибируют аденилатциклазу, несмотря на то, что имеют изоформы рецепторов, сопряженные с Gs-белком.

Таким образом, сопряжение адренергических рецепторов с кальциевой сигнализацией за счет повышения уровня экспрессии альфа1а-адренорецепторов путем HTR/Gs-белок/аденилатциклаза/цАМФ в МСК регулируется норадреналином и серотонином. Работа проводилась при поддержке Грантов Президента России МК-3167.2017.7 и РНФ 14-15-00439.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СУПЕРПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА НА СВОЙСТВА МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Шаблюк Н.О.^{1,2*}, Бобков Д.Е.¹, Блинова М.И.¹, Шевцов М.А.¹, Николаев Б.П.³, Яковлева Л.Ю.³, Юдинцева Н.М.¹

1. ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

2. Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

3. ФГУП Гос НИИ ОЧБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

*nik3245@mail.ru

Интеграция наночастиц в медицину в качестве лечебных или диагностических инструментов является быстро развивающейся областью, с большим потенциалом использования в регенеративной медицине. В настоящее время суперпарамагнитные наночастицы оксида железа (superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs)) одобрены FDA для клинического применения (усиление контрастирования в МРТ, целевая доставка лекарственных препаратов, терапия опухолей). Применение наночастиц в клеточной терапии позволяет проследить дальнейшую судьбу имплантированных в организм клеток. Несмотря на то, что SPIONs являются единственными оксидами металла, одобренными для медицинского применения, их влияние на функции клетки все еще обсуждается.

Цель работы: исследование влияния SPIONs на функции клеток, в частности, на экспрессию цитоплазматических белков в условиях *in vitro*.

Материалы и методы: в работе были использованы мезенхимальные клетки костного мозга человека (FET MSCs). Предварительно МСК инкубировали со SPIONs (размер частиц ≤ 50 нм) с концентрацией 150 мкг/мл в течение 24 ч. Затем клетки, включившие SPIONs, пересеивали в соотношении 1:3, после чего инкубировали в течение различных промежутков времени: 1, 3, 6, 10, 24 и 48 ч. и фиксировали замораживанием. С использованием методов белкового электрофореза и иммуноблотинга был проанализирован цитоплазматический клеточный экстракт.

Результаты и выводы. Были обнаружены количественные различия в содержании цитоплазматических белков в экспериментальном варианте и контрольных клетках, не содержащих наночастицы. Показано, что включение SPIONs клетками эффективно влияет на экспрессию цитоплазматических белков с молекулярными массами 55 кДа и 70 кДа (предположительно, тубулина и БТШ-70) на сроках 3, 6, 10, 24 ч. Кроме того, на тех же временных сроках с помощью иммуноблотинга была выявлена разница в содержании цитоплазматического G-актина, что предполагает влияние наночастиц на характер организации цитоскелета и способность клеток к миграции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Гранта РФФ № 14-50-00068.



StemCellBio 2018



**ПОКРОВСКИЙ БАНК
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**



MERCK

**ЛАБ
Инструментс**

BCM
БИОХИММАК

LabTech

**BECKMAN
COULTER**
Life Sciences

Биолаб Ltd

BI
Biological Industries
Culture of Excellence

macopharma
DESIGNED FOR LIFE

BioCommerce

BioLine
группа компаний

БМТ

ПанЭко

helicon

AlaMed



Криомедтех

INNOVATIVE MEDICAL TECHNOLOGIES
IMT
ИННОВАЦИОННЫЕ МЕДИЦИНСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ

ДИАМ
ДИНАМИКА

30
stem

Информационные партнёры:



МВ МЕДВЕСТНИК
ПОРТАЛ РОССИЙСКОГО ВРАЧА



Гены и Клетки

180
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ