



ЦЕНТР КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
«ПОКРОВСКИЙ»



ИНСТИТУТ
ЦИТОЛОГИИ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК



StemCellBio-2023

Трансляционная медицина – спектр возможностей

Сборник материалов конференции
и Школы-конференции «Коллекции культур клеток
человека и животных: современные вызовы и сетевые
решения»



StemCellBio
2023

**ТРАНСЛЯЦИОННАЯ
МЕДИЦИНА –
СПЕКТР ВОЗМОЖНОСТЕЙ**

16-18 ноября, Санкт-Петербург

profilab



РЕШЕНИЯ ДЛЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ОТ КОМПАНИИ HIMEDIA

- Бессывороточные среды для культивирования стволовых клеток STEMint
- Сыворотки, протестированные для работ со стволовыми клетками
- Среды для криоконсервации МСК
- Наборы для дифференцировки клеток
- Прочие реагенты для клеточной и молекулярной биологии



Также для заказа доступна продукция других производителей: ThermoFisher, Sigma-Aldrich, Illumina, Bio-Rad, Qiagen, Bioer и др.

ООО «Профилаб»
(812) 677-52-65

info@pfgroup.ru
www.pfgroup.ru



BCM
БИОХИММАК

Комфортная среда для ваших клеток

снижение цен
на культуральные
продукты Elabscience



Большое разнообразие высококачественных культуральных продуктов от ведущего мирового производителя Elabscience по доступным ценам. Складские запасы, большой выбор, быстрая доставка. Всё для Вашей успешной работы!

Ваш БиоХимМак!

psc@biochemmack.ru

ЦЕНТР КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ «ПОКРОВСКИЙ»
ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

STEMCELLBIO-2023

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА – СПЕКТР ВОЗМОЖНОСТЕЙ

Сборник материалов конференции
и Школы-конференции «Коллекции культур
клеток человека и животных: современные вызовы
и сетевые решения»



ПОЛИТЕХ-ПРЕСС

Санкт-Петербургский
политехнический университет
Петра Великого

Санкт-Петербург
2023

StemCellBio-2023. Трансляционная медицина – спектр возможностей : сборник материалов конференции и Школы-конференции «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения». – СПб. : ПОЛИТЕХ-ПРЕСС, 2023. –141 с.

В сборник включены краткие тезисы устных и постерных докладов, представленных на конференции «StemCellBio-2023. Трансляционная медицина – спектр возможностей» и прошедшей в предконференционный день Школы-конференции молодых ученых «Коллекции культур клеток человека и животных: современные вызовы и сетевые решения».

Цель проведения конференции – сформировать у участников представление о современном состоянии регенеративной медицины в России, о новейших научных исследованиях в области биологии стволовой клетки. Также задачей конференции и школы-конференции является привлечение молодых специалистов к решению актуальных задач современной науки, формирование единого научно-образовательного пространства, установление научных связей между специалистами смежных областей (биологии, медицины, материаловедения, физики, химии).

Проведение конференции поддержано Министерством науки и высшего образования РФ, соглашение № 075-15-2021-1063

Редакционная коллегия:

Н. И. Енукашвили (кандидат биологических наук),
В. В. Багаева, Е. А. Котелевская, А. А. Клишина

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|-----------------------|----|
| Устные доклады..... | 4 |
| Пленарные..... | 5 |
| Секционные..... | 9 |
| Стеновые доклады..... | 72 |

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

- 1.Пленарные**
- 2.Секционные**

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОЖНОГО ПОКРОВА ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ЭКВИВАЛЕНТА КОЖИ - ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ IN VIVO.

М.Н. Егорихина^{1,*}, Л.Б. Тимофеева¹, Ю.П. Рубцова¹, И.Н. Чарыкова¹, Д.Д. Линькова¹,
Е.А. Фарафонтова¹, М.Г. Рябков¹, П.В. Перетягин¹, Д.Я. Алейник¹.

ФГБОУ ВО "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород, 603005

egorihina.marfa@yandex.ru

Восстановление дефектов кожного покрова при различных повреждениях, таких как обширные ожоги, длительно не заживающие язвы, обширные механические раневые повреждения и пр., является актуальным вопросом во всем мире. Общемировым трендом, направленным на решение данного вопроса, является использование клеточных технологий и продуктов тканевой инженерии, в частности скаффолд-технологий.

В ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России разработан тканеинженерный конструкт – эквивалент кожи (ЭК) на основе биополимерного скаффолда-носителя с инкапсулированными мезенхимальными стволовыми клетками жировой ткани (Пат.№2653434 РФ... от 11.04.2017). На этапах доклинических исследований *in vitro* было показано, что скаффолд способен выступать в качестве искусственной клеточной ниши и обеспечивать не только поддержание функциональной активности МСК, но и процессы сходные с естественными процессами «динамической взаимности». Следующим неотъемлемым этапом исследования является подтверждение безопасности и эффективности продуктов в рамках доклинических исследований *in vivo*. При проведении исследований биосовместимости *in vivo* согласно ISO 10993-6-2021 было показано, что при имплантации в ткани животного (крысы) происходит полное замещение ЭК компонентами соединительной ткани, подтверждено отсутствие острого воспалительного процесса. Наблюдаемые процессы рекрутинга клеток в скаффолд из окружающих тканей и активное образование коллагеновых волокон свидетельствовали о протекании процесса регенерации в области имплантации.

Проведено исследование эффективности ЭК *in vivo* на модели полнослойной скальпированной кожной раны крыс (группы ран: 1 – под увлажняющей повязкой; 2 – со скаффолдом-носителем без клеток; 3 – с ЭК). Животных выводили из эксперимента на 7, 21 и 25-28 сутки. ЭК, способствовал раннему формированию грануляционной ткани, ускорению процессов ангиогенеза, образованию и организации правильно упорядоченных коллагеновых волокон в подлежащей ткани, ускорению эпителизации. Следующий этап: исследование на крупных лабораторных животных – свиньях. Животным формировали 6 полнослойных скальпированных ран: 2 – контрольные, 2 – имплантация в область дефекта ЭК, 2 – имплантация в область дефекта бесклеточного скаффолда-носителя. Гистологическое исследование - на 7 и 42 сутки. Использование скаффолда и ЭК ускоряло процесс созревания соединительной ткани в области раны по сравнению с контролем. При этом ремоделирование соединительной ткани регенерата при применении ЭК происходило быстрее, чем при использовании скаффолда.

Таким образом, представленный тканеинженерный конструкт может стать эффективным инструментом регенеративной медицины и использоваться, в частности, для восстановления мягких тканей.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках Госзадания № 121022500010-6 (ЕГИСУ).

РОСТ ТКАНИ В ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ И ЕГО ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ

Р.Ю. Еремичев¹, П.П. Нибирицкий^{1,2}, Н.А. Александрович^{1,2}, Е.А. Слободкина¹,
В.А. Ткачук^{1,2}, П.И. Макаревич^{1,2,*}

¹ Институт регенеративной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

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

* pmakarevich@mc.msu.ru

В организме человека эпиморфная регенерация после повреждения ограничена склонностью тканей к фиброплазии, но не исключена. Примерами регенерации без образования рубца является менструальный цикл с повреждением и восстановлением эндометрия, заживление переломов костей и заживление неглубоких дефектов мягких тканей. Среди разнообразия резидентных клеток ведущую роль в регуляции ответа на повреждение играют клетки стромы мезенхимного происхождения (МСК), обнаруженные практически во всех тканях организма.

В настоящее время наша работа сконцентрирована на изучении регуляции ответа на повреждение тканей человека и роли МСК в его реализации. Ключевой особенностью этого процесса является активация программ роста, которые могут частично опираться на принципы, реализуемые в ходе эмбриогенеза, в частности – на иерархическую модель, в которой новая структура разворачивается на основе уже сформированной. В постнатальном периоде ответ на повреждение всегда идет с вовлечением оставшихся интактными или неразрушенными тканей и по нашим представлениям базовой структурой в этом ответе является соединительная ткань и входящие в ее состав стромальные клетки, в т.ч. МСК.

Особенно важным в понимании роста ткани после повреждения нам представляется расшифровка механизмов регуляции баланса двух ключевых процессов - фиброза и регенерации, которые зависят от дифференцировочного пути МСК и факторов, определяющих его в ходе репаративного ответа ткани. Нами установлено, что в ходе заживления без рубца дифференцировка МСК зависит не столько от ткани, из которой они были выделены, сколько от растворимых факторов окружения, которые могут как активировать их дифференцировку в миофибробласты, так и препятствовать ей, регулируя таким образом исход заживления. В частности, многократная регенерация эндометрия без фиброзирования зависит от факторов, содержащихся в менструальном отделяемом, которые блокируют фенотипический переход МСК в миофибробласты, причем это действие проявляется не только на МСК эндометрия, но и на других тканях (дерме, жировой ткани), склонных к образованию рубца.

Нами также было установлено, что МСК обладают автономной (т.е. сохраняющейся в культуре) способностью к самоорганизации, которая приводит к их коммитированию и усилению продукции секретов, состав которого разительно отличается от секретов МСК в обычной культуре. Расшифрованные механизмы, определяющие эту самоорганизацию и ее последствия для дифференцировки МСК, роднят ее с процессом конденсации мезенхимы в эмбриогенезе, необходимым для морфогенеза большинства соединительных тканей организма.

Таким образом, регуляция формирования соединительных тканей при участии МСК может быть важнейшим аспектом ответа на повреждение, а баланс регенерации и фиброзирования является не только тканеспецифичной особенностью, но и следствием возникающих при повреждении физиологических условий – в частности, действия растворимых факторов и пространственной организации МСК.

Работа была выполнена в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова и поддержана грантом Российского научного фонда №19-75-00067.

КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ В КАРДИОЛОГИИ: ЕСТЬ ЛИ «СВЕТ В КОНЦЕ ТОННЕЛЯ»?

Е.В.Парфенова^{1,2}

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" МЗ РФ, Москва, 121552

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

eparfyon@mail.ru

Более полувека сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются важной причиной смертности и заболеваемости во всем мире, несмотря на прогресс в методах лечения, что диктует необходимость поиска новых терапевтических подходов. Относительно недавно таким альтернативным подходом к лечению ССЗ явилась клеточная терапия, использующая различные типы клеток. Доклад посвящен анализу применения в кардиологии современных терапевтических стратегий, базирующихся на использовании стволовых клеток. Обсуждаются проблемы, связанные с использованием клеточной терапии, и пути их преодоления, которые могли бы способствовать повышению эффективности этого метода лечения при заболеваниях сердца. Приводится новый взгляд на механизмы, регулирующие функции стволовых клеток с акцентом на роль микроокружения в поддержании жизнеспособности клеток и их регенеративного потенциала после трансплантации; обсуждается, как это может реализоваться в осуществимых способах доставки клеток. В качестве нового поколения клеточной регенеративной терапии предлагаются тканеинженерные конструкции в виде клеточных пластов, в которых хотя бы частично сохраняется привычное клеточное микроокружение, поддерживающее их жизнеспособность и регенеративные свойства. Приводятся собственные данные автора по эпикардальной трансплантации клеточных пластов, сформированных из мезенхимных стромальных клеток жировой ткани, генетически модифицированных для повышенной продукции фактора стволовых клеток (SCF). Показано, что такой способ трансплантации клеток и модификация значительно повышают выживаемость клеток и эффективность клеточной терапии экспериментального инфаркта миокарда. Обсуждаются перспективы «клеточной терапии без клеток» на основе использования экзосом стволовых клеток. Анализируются возможности замещение утраченной при инфаркте части миокарда, кардиомиоцитами, полученными из эмбриональных стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток. Обсуждаются перспективы прямого репрограммирования фибробластов в кардиомиоциты *in vitro* и *in vivo*.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 19-15-00384.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МСК И ПСК НА БЕССЫВОРОТОЧНЫХ СРЕДАХ

П.Л. Гнеденков¹

¹ Общество с ограниченной Ответственностью «Сарториус Стедим РУС», г.Санкт-Петербург, 199178,

* - pavel.gnedenkov@sartorius.com

Культивирование стволовых клеток человека становится важным методом не только в исследованиях, но и в медицине. Клеточная терапия и регенеративная медицина все чаще используются в реальной клинической практике и из экзотики превращаются в общеупотребительные методы. Однако классические протоколы культивирования клеток человека подразумевают использование значительных количеств нативной сыворотки человека или животных. Помимо того, что эти компоненты достаточно дороги, они обладают непостоянным составом, обеспечивая дополнительную вариабельность процесса. Также они являются потенциальным источником биологической опасности, поскольку гарантировать вирусную и прионную чистоту сыворотки невозможно.

Бессывороточные среды для стволовых клеток представляют собой уникальные биологические материалы, которые играют важную роль в развитии и применении стволовых клеток в медицинских исследованиях и терапии. Основным преимуществом бессывороточных сред является их способность обеспечивать условия для роста и дифференцировки стволовых клеток без использования животных или цельных человеческих сывороток.

Использование бессывороточных сред делает процесс культивирования стволовых клеток более безопасным, регулируемым и эффективным, позволяя исследователям и врачам контролировать и оптимизировать условия для роста клеток. Также это позволяет регуляторам продвинуться в области сертификации и регистрации клеточных продуктов. Это, в свою очередь, способствует развитию новых методов лечения различных заболеваний, связанных с использованием стволовых клеток, таких как регенеративная медицина, онкология и иммунология.

Линейка бессывороточных сред NutriStem[®] является хорошо зарекомендовавшим себя решением для этой цели. NutriStem[®] hPSC XF позволяет культивировать плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) на подложке или в псевдосуспензии, при этом морфологические, серологические и культуральные показатели остаются постоянными в различных экспериментах. Так, пролиферация ПСК на среде NutriStem hPSC XF в течение 144 часов позволила добиться роста числа жизнеспособных клеток со 100 до 400 тыс./см², при этом плюрипотентность клеток была полностью сохранена, что подтверждается их способностью образовывать эмбриониды *in-vitro* и тератомы *in-vivo*.

NutriStem[®] XF предназначена для культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) и успешно применяется для выращивания МСК в экспериментальных и медицинских целях, позволяя в некоторых случаях добиться лучших результатов, чем среды на основе фетальной бычьей сыворотки. Так, использование NutriStem[®] XF в процессе изоляции МСК позволяет добиться увеличения количества живых клеток в 2–3 раза, а при использовании для культивирования добиваться титров 30– 60 тыс./см² при сохранении нормальной морфологии всех типов МСК

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПАРАКРИННОГО ЭФФЕКТА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЖЕЛУДОЧКОВЫЕ КАРДИОМИОЦИТЫ

А.А. Аитова^{1,2*}, В.А. Цвеляя^{1,2,3}, К.И. Агладзе^{1,3}

¹Московский физико-технический институт, Москва, Россия

²Альметьевский государственный нефтяной институт, Альметьевск, Россия

³Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени Владимирского, Москва, Россия

* - aitova.aa@phystech.edu

В строме костного мозга существует подмножество негематопозитических клеток, называемых мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Эти клетки могут быть размножены и далее дифференцированы в другие типы клеток, что делает их уникальным инструментом клеточной терапии.

Клеточная терапия - одна из многообещающих стратегий современной медицины. Тканевая инженерия сердца и клеточные технологии, включающие и прямую инъекцию клеток, являются ключевыми подходами для лечения заболеваний сердца, однако, подобные методы сопряжены с рядом сложностей: функциональной активностью кардиомиоцитов после пересадки и возможность иммунного ответа со стороны тканей хозяина. [1] Решением этих проблем служат стволовые клетки, полученные от пациента, в частности, мезенхимальные стволовые клетки и другие. Способность таких клеток к дифференцировке в самые разные типы делает возможным их использование в клеточной терапии. [2]

Представленная работа посвящена изучению паракринного эффекта при дифференцировке стволовых клеток. Паракринный эффект позволяет дифференцировать клетки непосредственно в ткани до терминальной стадии дифференцировки, что дает возможность создания межклеточных связей. Выявление этапов дифференцировки с помощью паракринного эффекта и возможности подсадки дифференцируемых клеток в ткань на разных этапах и являлись задачами данной работы. Для решения представленных задач в работе использовались ИПСк и МСК человека. Были поставлены и модифицированы протоколы выделения МСК из биопсии костного мозга человека. [3] Получены клеточные линии МСК. Тестировались подложки для оптимального культивирования и дифференцировки МСК. Был получен один протокол дифференцировки из МСК в кардиомиоциты с помощью факторов, получаемых из параллельной дифференцировки ИПСк в кардиомиоциты с выходом около 10%. Полученные клетки были охарактеризованы с помощью иммуноцитохимического анализа и оптического картирования с использованием кальций-зависимого красителя. Далее полученные клетки будут подсажены в сердце крысы для проверки функциональной интеграции в ткань сердца.

1. Kehat I. et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells //Nature biotechnology. – 2004. – Т. 22. – No. 10. – С. 1282-1289.

2. Jaenisch R., Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming //Cell. – 2008. – Т. 132. – No. 4. – С. 567-582.

3. Majumdar M. K. et al. Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells //Journal of Cellular Physiology. – 2000. – Т. 185. – No. 1. – С. 98-106.

ОПЫТ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ IN VITRO МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ И МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КЛЕТОК.

Д.Я. Алейник^{1,*}, М.Н. Егорихина¹, И.Н. Чарыкова¹, Ю.П. Рубцова¹, Д.Д. Линькова¹,
В.А. Юдин², Ковылин Р.С.², С.А. Чесноков²

¹ ФГОБУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения России, Нижний Новгород, 603005

² Институт металлоорганической химии РАН, Нижний Новгород, 603137
daleynik@yandex.ru

Восстановление костных дефектов остается актуальной проблемой современной хирургии. Для этих целей разрабатываются материалы различного состава и структуры, но, к сожалению, идеального заменителя собственной кости не существует. Несмотря на большое количество разработок, очень незначительное количество из них доходит до клиники. Основным недостатком материалов является отсутствие клеточного компонента. Поэтому вектор разработок последних лет направлен на создание клеточно-инженерных конструкций.

Одним из ключевых вопросов, возникающих в процессе разработки материалов для таких продуктов, остается вопрос цитосовместимости. Известно, что живые клетки могут менять свои характеристики при взаимодействии с материалом. Существующие стандарты ISO, на основе которых проводятся испытания цитотоксичности материалов, часто оказываются недостаточными. Спектр исследований материалов *in vitro* может быть расширен, что создаст условия для сокращения этапов исследования на животных, уменьшения расходов и времени выхода продукта в клинику.

Цель работы – разработка подходов к оценке цитосовместимости материалов с использованием моделей *in vitro*, позволяющих дать прижизненную характеристику клеток в процессе взаимодействия с материалом.

Материалы и методы. В работе использованы методы световой, фазово-контрастной, флуоресцентной, сканирующей электронной микроскопии, иммуноферментного анализа и др. В качестве тестовых культур использовали поверхностнозависимые клетки: клетки дермы человека, МСК жировой ткани человека и животных. Оценивали цитотоксичность, адгезию клеток, жизнеспособность, пролиферативную и секреторную активность при взаимодействии клеток с материалом.

Результаты. Разработан и апробирован на различных структурах комплекс методов оценки цитосовместимости материалов *in vitro* на основе стандартов ISO и ГОСТов РФ. Разработанный подход позволит: отсеять непригодные для использования материалы и выбрать наиболее перспективные, определить направления модификации материалов, сократить программу доклинических исследований *in vivo*. В результате такого подхода уменьшится стоимость и время доклинических исследований *in vivo*, и будут обеспечены условия для сокращения времени выхода нового продукта в клинику.

Финансирование. Работа выполнена в рамках реализации программы «Приоритет-2030».

ИССЛЕДОВАНИЕ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO* БИОСОВМЕСТИМОСТИ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ И ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА НА ОСНОВЕ ГИДРОГЕЛЯ КОЛЛАГЕНА

Э.И. Александер-Синклер^{1*}, Н.В. Едоменко¹, А.А. Кольке², Е.В. Зиновьев², Завацкий В.В.², Д.В. Костяков², М.И. Блинова¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, 192242

* - elga.aleks@gmail.com

С учетом своего пограничного положения кожа является наиболее часто и легко повреждаемым органом. Повреждения кожи в результате механических и термических травм, сахарного диабета, генетических нарушений и хирургического вмешательства могут привести к возникновению ран. В лечении острых и хронических ран широко используются различные стратегические подходы, которые включают применение раневых покрытий (РП), действие которых направлено на различные аспекты процесса заживления [1]. В настоящее время для терапии ран предложено множество РП, особое место среди них занимают тканеинженерные биологические покрытия (ТБП), представляющие собой эквиваленты кожи, при создании которых используют клетки кожи, заселенные на различные носители [2]. Однако применение ТБП клинической практике сопряжено с применением других РП в качестве вторичного покрытия. Выбор вторичных РП является актуальной проблемой и должен основываться не только на особенностях раны, но и на биосовместимости с клеточной составляющей ТБП.

В данной работе мы исследовали в условиях *in vitro* биосовместимость РП разных типов (Syspyr-derm[®], Парапран с хлоргексидином, Lomatuell[®] Н, Воскопран с мазью Левомиколь, Metalline[®], Granuflex[®], ХитоПран, HydroTac Transparent, Бранолинд Н, Aquacel Foam Adhesive, Aquacel Ag+) и эквивалента кожи, представляющего из себя гидрогель коллагена I типа, заселенный дермальными фибробластами (ДФ). Биосовместимость РП и ТБП оценивали по влиянию РП на жизнеспособность ДФ в составе ТБП, используя МТТ-тест и методы световой и флуоресцентной микроскопии. Проведенное исследование выявило, что из числа исследованных РП только Парапран[®] с хлоргексидином, обладает высокой биосовместимостью с эквивалентом кожи на основе коллагенового гидрогеля, заселенного ДФ, что позволяет рекомендовать их к совместному применению в клинике. Применение совместно с дермальным эквивалентом Syspyr-derm[®], Бранолинд Н[®], Aquacel adhesive foam[®], Aquacel Ag+[®] нецелесообразно, вследствие их низкой биосовместимости с данным эквивалентом кожи.

1. Mirhaj, M., Labbaf, S., Tavakoli, M., & Seifalian, A. M. (2022). Emerging treatment strategies in wound care. *International Wound Journal*, 19(7), 1934-1954.
2. Shpichka, A., Butnaru, D., Bezrukov, E. A., Sukhanov, R. B., Atala, A., Burdukovskii, V., Zhang, Y., & Timashev, P. (2019). Skin tissue regeneration for burn injury. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 94.

РАЗРАБОТКА СЕТЧАТКОПОДОБНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ КОЛБОЧКОВОЙ ДИСТРОФИИ АССОЦИИРОВАННОЙ С МУТАЦИЯМИ В ГЕНЕ KCNV2

А. Алсаллум*, О.Н. Митяева, П.Ю. Волчков.

Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный, 141701.
almasdadalsalloum@gmail.com

Колбочковая дистрофия со сверхнормальной активности палочек (CDSRR) — аутосомно-рецессивное заболевание, которое приводит к прогрессирующей дегенерации сетчатки. Заболевание вызвано мутациями в гене KCNV2, который кодирует субъединицу Kv8.2 потенциал-зависимого калиевого канала. Как и в случае с другими аутосомно-рецессивными заболеваниями, CDSRR является хорошим кандидатом для генной терапии, основной стратегией которой является экзогенная экспрессия гена дикого типа в фоторецепторах сетчатки. В качестве модельных объектов при разработке генотерапий офтальмопатий могут быть использованы экспланты сетчатки человека, приматов, нокаутных мышей [1]. Однако все эти модели являются субоптимальными – либо не имеют мутации, ассоциированной с заболеванием, либо это животные модели со строением сетчатки, далеким от человеческой. Новой альтернативой является использование ткани сетчатки, полученной из индуцированных стволовых клеток пациентов. Органоиды, полученные из ИПСК пациентов, проявляют свойства патологической сетчатки и могут быть использованы для проверки эффективности генотерапий [2].

В результате работы был оптимизирован протокол получения органоидов сетчатки человека. Органоиды были охарактеризованы методами иммуноцитохимии, ПЦР в реальном времени и проточной цитометрии на наличие различных типов клеток, характерных для сетчатки (фоторецепторы, биполярные, ганглионарные клетки, клетки пигментного эпителия). Был разработан протокол функционального электрофизиологического анализа отдельных клеток органоидов методом Patch-Clamp.

Для пары мать (гетерозигота по мутации KCNV2)-ребенок (компаунд гетерозигота по мутации KCNV2) были получены ИПСК с дальнейшей дифференцировкой в органоиды сетчатки, проведено молекулярное и функциональное сравнение их характеристик.

Источник финансирования: соглашение о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг №075-01645-22-06, проект № 720000F.99.1.B385AV67000.

1. Deng, W. L. Gene correction reverses ciliopathy and photoreceptor loss in iPSC-derived retinal organoids from retinitis pigmentosa patients [text]/ W. L. Deng, M. L. Gao, X. L. Lei, J. N. Lv, H. Zhao, K. W. He// Stem Cell Rep. - 2018. - V. 10. - P.1267–1281.
2. O'Hara-Wright, M. Retinal organoids: a window into human retinal development [text]/ M. O'Hara-Wright, A.Gonzalez-Cordero//Development. - V. 147. - P.27.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИПЛОИДИИ НА ТРАНСКРИПТОМ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

О.В. Анацкая, А.Е. Виноградов

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

olga.anatskaya@gmail.com

Мезенхимные стволовые клетки (МСК) - один из самых надежных источников стволовых клеток для тканевой инженерии и ускорения регенерации. МСК способны дифференцироваться в хрящевую, костную, соединительную, мышечную, жировую и другие ткани. В то же время, приемлемыми являются только те типы МСК, которые доказали свою онкологическую безопасность и эффективность в рандомизированных исследованиях. Известно, что в процессе культивирования МСК могут накапливать геномы, становясь полиплоидными [1]. В настоящее время, данные о влиянии полиплоидии на транскриптом МСК практически отсутствуют. Существует лишь несколько статей с противоречивыми сведениями и выводами. Известно, что в дифференцированных и опухолевых клетках полиплоидия ассоциирована с устойчивостью к стрессу и апоптозу, а также с повышенной склонностью к опухолевой трансформации и метастазированию [2,3]. Эти сведения побудили нас исследовать общие проявления полиплоидии в разных типах МСК и в клетках опухолей. В работе были проанализированы базы данных, включающие транскриптомы полиплоидных и диплоидных клеток опухолей, а также МСК костного мозга, плаценты и сердца. Чтобы выявить общие признаки полиплоидии, мы исследовали дифференциально-экспрессированные гены (ДЭГи) при сравнении полиплоидных и диплоидных клеток. Было проанализировано обогащение ДЭГов генными модулями из различных баз данных (BioSystems, KEGG, Reactome, Gene Ontology и др.), а также кластерами сетей межбелковых взаимодействий и молекулярными комплексами из базы MCODE. Кроме того, мы провели погенное сравнение ДЭГов для всех типов поли/диплоидных клеток. Сравнение генных модулей дало возможность оценить изменения в сигнальных каскадах и метаболических путях, в то время как погенное (gene-by-gene) сравнение позволило найти регуляторы этих глобальных изменений. Проведенные сравнения показали, что во всех типах клеток полиплоидия ассоциирована с активацией генных модулей, относящихся к регуляции экспрессии генов, сплайсингу, синтезу белка, ответу на стресс, клеточному циклу, мейозу и гаметогенезу и ацетилированию гистонов. Наши данные также выявили подавление некоторых путей регуляции иммунного ответа, апоптоза и циркадных ритмов. Погенное сравнение наиболее сильно дерегулированных генов показало, что причиной найденных изменений является активация комплексов ремоделирования хроматина, приводящая к его открытию. В заключение важно отметить, что, хотя сравнение транскриптомов не выявило взаимосвязи между признаками онкогенной трансформации и полиплоидией в МСК, включая индукцию онкогенов, перед применением МСК необходимо провести их очистку от полиплоидных клеток. Эта процедура улучшит терапевтические свойства МСК и их онкологическую безопасность, а также безопасность окружающих их клеток.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28 сентября 2021 г.).

1. Fajka-Boja R, Marton A, Tóth A. et al. BMC Cancer. 2018. 18(1):872. doi: 10.1186/s12885-018-4781-z.
2. Anatskaya OV, Vinogradov AE. . Int J Mol Sci. 2022;23(17):9691. doi: 10.3390/ijms23179691.
3. Anatskaya OV, Vinogradov AE. Int J Mol Sci. 2022 Mar 24;23(7):3542. doi: 10.3390/ijms23073542.

ИЗУЧЕНИЕ ФУНКЦИЙ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ В ДИНАМИКЕ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ

Е. И. Бахмет

Институт Цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

e.bakhmet@incras.ru

На сегодняшний день накоплено большое количество информации о плюрипотентных стволовых клетках (ПСК) и об основных регуляторных белках, необходимых для поддержания плюрипотентности. К таким белкам относятся транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 и другие. Большинство работ, посвящённых изучению их функций, проводятся на клетках в статичном плюрипотентном состоянии, далёком от динамичных процессов их созревания и спецификации, которые происходят во время эмбриогенеза. При этом, современные методы молекулярной и клеточной биологии позволяют на клеточных культурах моделировать развитие эпибласта с последующей дифференцировкой клеток в различных направлениях.

Такой подход, например, позволил нам выявить роль полиЦ-связывающего белка Pcbp1 в переходе ПСК из наивного в более позднее праймированное состояние. Нокаут гена *Pcbp1* в ПСК мыши приводил к повышенной спонтанной дифференцировке, но клетки оставались плюрипотентными и жизнеспособными. Однако во время перехода ПСК из наивного в праймированное состояние, которое во время эмбриогенеза происходит при имплантации плода, наблюдалась клеточная гибель и снижение пролиферации. Анализ, включающий ChIP-seq, RNA-seq и масс-спектрометрию, показал, что Pcbp1 является регулятором C1-метаболизма, гликолиза и синтеза аминокислот. Таким образом, стало возможным объяснение раннего летального фенотипа эмбрионов мыши с нокаутом по *Pcbp1*.

Также наш интерес связан с изучением функций факторов Oct4, Sox2 и Nanog в выборе направления дифференцировки ПСК. Некоторые работы указывают на остаточную экспрессию этих широко известных регуляторов плюрипотентности в начале спецификации в экто-, мезо- и энтодермальном направлении. Для этих исследований мы освоили метод индуцибельной деградации белка, который позволяет элиминировать нужный фактор непосредственно в начале дифференцировки. Так, с помощью этого подхода мы установили, что деградация Nanog в начале энтодермальной дифференцировки ПСК ведёт к достоверному снижению количества энтодермальных предшественников в пять раз, но не влияет на выбор этого пути спецификации.

Таким образом, методы моделирования развития эпибласта *in vitro* позволяют во-первых, обнаружить принципиально новые функции транскрипционных факторов, а во-вторых, по-новому взглянуть на роль ключевых известных регуляторов плюрипотентности. Такие исследования крайне необходимы для понимания базовых механизмов эмбриогенеза, и как следствие, для адекватного применения ПСК в регенеративной медицине.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-75-10096, <https://rscf.ru/project/23-75-10096/>.

ПОВТОРНЫЕ ЦИКЛЫ ИНТРАКОРОНАРНОГО ВВЕДЕНИЯ АУТОЛОГИЧНОЙ МОНОНУКЛЕАРНОЙ ФРАКЦИИ КОСТНОГО МОЗГА ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ПАЦИЕНТОВ С ДИЛАТАЦИОННОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ

С.А. Белый*, В.В. Комок, В.И. Лукашенко, Е.В. Бабенко, М.А. Городнова, С.В. Лапекин, А.В. Кривенцов, А.В. Бирюков, Д.В. Овчаренко, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И.П.Павлова, Санкт-Петербург, 197022
sabel1968@mail.ru

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) - заболевание неясной этиологии, которое проявляется тяжелой сердечной недостаточностью и часто приводит к трансплантации сердца, не смотря на рекомендованную медикаментозную терапию[1]. Поэтому необходима разработка новых методов хирургического лечения ДКМП. Появляется все больше данных об эффективности применения клеток аутологичной моноклеарной фракции костного мозга (АМФКМ) у пациентов с ДКМП [2]. Целью нашей работы было оценить эффективность повторных циклов интракоронарного введения АМФКМ для лечения пациентов с ДКМП. В группу исследования на июнь 2023г включено 11 пациентов с ДКМП. Средний возраст составил 48 +/- 8 лет. Мужчин 10, женщин 1. Исходный функциональный класс ХСН III (230 метров). Исходная фракция выброса левого желудочка (ФВ ЛЖ) составила 25 +/- 10 %. Повторные интракоронарные введения выполнены 7 пациентам в сроки от 9 до 20 месяцев (в среднем через 14 месяцев от первого введения). Всем пациентам выполнялось ЭХОКГ (vivid 7) исследование, некоторым однофотонная компьютерная томография (ОФЭКТ) с технетрилом для оценки перфузии миокарда. Наша научная группа применяет интракоронарное введение клеток АМФКМ для лечения пациентов с ДКМП с 2003г[3]. За 20-летний период наблюдения погибло 11 пациентов (31%). Из них сердечная смерть зафиксирована у 7. Учитывая хорошие результаты, мы предположили, что повторное введение не ранее чем через 12 месяцев от первого может значительно повысить эффективность лечения [3]. На настоящий момент результаты повторного введения АМФКМ можно оценить у 6 пациентов. У пяти из них произошло значительное обратное ремоделирование левого желудочка (ЛЖ). Средняя фракция выброса составила 54%. Функциональный класс ХСН I (450 метров). Отмечалось прогностически значимое снижение NTproBNP у всех пациентов. По данным ОФЭКТ миокарда с технетрилом исходные показатели перфузии и сократимости ЛЖ значительно улучшались в динамике. Представленные данные показывают выраженный антиремоделирующий эффект повторных введений АМФКМ у пациентов с ДКМП, что может привести к новому эффективному хирургическому методу лечения этой категории пациентов. Требуется подтверждение эффективности предлагаемого метода на большем количестве больных. *Работа выполняется в рамках государственного задания.*

1. Merlo M., Caiffa T., Gobbo M. et al. Reverse remodeling in Dilated Cardiomyopathy: Insights and future perspectives // IJC Heart & Vasculature. 2018. vol. 18. p. 52-57
2. Nso N., Bookani KR., Enoru ST. et al. The efficacy of bone marrow mononuclear stem cell transplantation in patients with non-ischemic dilated cardiomyopathy-a meta analysis // Heart Fail Rev.2022. vol. 27. №3. P.811-820.
3. Белый, С. А., Лукашенко В. И., Комок В. В., Хубулава Г. Г. Клеточная терапия в комплексном лечении пациента с ДКМП. Клиническое наблюдение // Кардиология. 2019. Т. 59, № S4. С. 59–64

АУТОЛОГИЧНЫЕ МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА: ПРАКТИЧЕСКИЙ ОПЫТ 20 ЛЕТ ПРИМЕНЕНИЯ

С.А. Белый*, А.С. Немков, Г.Г. Хубулава

ПСбГМУ им И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022.

sabel1968@mail.ru

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) и ее осложнения продолжают оставаться серьезной проблемой современного здравоохранения. В Российской Федерации на 2018 год зарегистрировано более 12 млн. пациентов с хронической сердечной недостаточностью (ХСН), 4,5 млн. человек имеют III-IV функциональный класс [1]. Диффузный характер поражения коронарных артерий, а также рецидив заболевания после выполненных методов реваскуляризации формирует группу больных с рефрактерной стенокардией (1,2 млн. человек). Это серьезная и растущая проблема требует разработки новых методов ее решения. Интракоронарное введение аутологичной моноклеарной фракции костного мозга (АМФКМ) - перспективный метод хирургического лечения ИБС. Эффективность применения АМФКМ у таких пациентов связана с улучшением процессов кровоснабжения миокарда, уменьшением апоптотической гибели кардиомиоцитов, фиброза в миокарде, появлением новых клеток, иммуномодулирующим/противовоспалительным действием [2]. В отличие от существующих эффективных методов хирургического лечения ИБС (реваскуляризации, ресинхронизирующей терапии, ИКД, трансплантации и механической поддержки сердца) данный метод теоретически может быть выполнен каждому пациенту. На 2023г. имеются данные 22 зарубежных системных обзоров, которые показали эффективность и безопасность применения клеток костного мозга у больных с постинфарктной ХСН, часть этих работ отметила увеличение выживаемости [2]. Наша научная группа с 2003 года имеет опыт применения трехсосудистого неокклюзионного метода интракоронарного введения АМФКМ у 100 пациентов с ХСН [3]. Через 60 месяцев наблюдения выживаемость пациентов из клеточной группы была в 2 раза выше, чем в контрольной. Также отмечалось значимое улучшение качества жизни этих тяжелых пациентов. С 2003 года мы имеем опыт лечения 135 пациентов с рефрактерной стенокардией. У большинства из них отмечалось улучшение кровоснабжения сердца, что привело к снижению функционального класса стенокардии, уменьшения количества таблеток нитроглицерина и увеличение толерантности к физической нагрузке. Данные 13 зарубежных исследований, в которые суммарно был включен 841 пациент с рефрактерной стенокардией, в целом подтверждают эффективность применения клеток костного мозга. В раннем послеоперационном периоде в группах наших пациентов не было летальных исходов и осложнений. Важно подчеркнуть, что до 20 лет наблюдения за пациентами не было выявлено каких-либо специфических осложнений, в том числе повышенного риска онкологических заболеваний, тяжелой органспецифической кальцификации и фиброза. Таким образом, на современном высокотехнологическом этапе развития практического здравоохранения возможно эффективное лечение больных с постинфарктной хронической сердечной недостаточностью и рефрактерной стенокардией.

Работа выполнялась в рамках государственного задания.

1. Клинические рекомендации. Хроническая сердечная недостаточность. / Министерство здравоохранения РФ. Российское кардиологическое общество. 2020
2. Fisher SA. et al. Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure // Cochrane Database Syst Rev. 2016.6
3. Белый С.А. и др Клеточная терапия ХСН // Кардиология. 2018. Т. 58. № S4. С. 46–54.

РЕСТИТУЦИЯ КОСТНОГО МОЗГА И ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА: НОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЫ В ТЕРАПИИ ПРОГРЕССИРУЮЩИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ, ОНКОЛОГИЧЕСКИХ, АУТОИММУННЫХ И НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

А.С. Брюховецкий¹, И.С. Брюховецкий³, Л.Ю. Гривцова²,
М.А. Шурдов¹, Н.И. Коваленко¹; М.А. Хакимзянова¹

¹АО Клинический госпиталь «НейроВита», Москва

²МНРЦ им .Ф.Цыба - филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России, Обнинск, Калужская область

³Медицинский центр ДВФУ, Владивосток

Клональность гемопоэза (КГ) является одним из достоверно доказанных молекулярно-биологических признаков процесса старения, сердечно-сосудистых болезней и гематоонкологических заболеваний (лейкозов, лимфом и др.). Решением проблемы борьбы с КГ в онкогематологии стала биотехнология трансплантации костного мозга (ТКМ) и трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Однако применение при этих болезнях ТКМ имеет риск смертельного исхода в 6-9% случаев, а фатальные осложнения лечения отмечаются в 35 % ТКМ. Нашими фундаментальными исследованиями было показано, что КГ является ключевым патогенетическим механизмом прогрессирования и возникновения рецидивов почти при всех неинфекционных хронических аутоиммунных болезнях (АИБ), нейродегенеративных болезнях (НДБ), ряда солидных злокачественных новообразований (ЗНО) и моногенных наследственных болезней (МГНБ), основной причиной старения и внезапной смерти (в 43% случаев). Для решения проблемы борьбы с КГ, осложнявшим течение прогрессирующих АИБ, НДБ, ЗНО и МГНБ была разработана биомедицинская технология *персонализированной реституции костного мозга* (ПРКМ) человека, как альтернатива ТКМ, реализующая те же цели – перепрограммирование системного иммунного ответа организма пациента. При этом она направлена не на миелоабляцию и приживление здорового клона ГСК в КМ человека, а на блокирование репродуктивности доминирующего в гемопоэзе аутологичного патологического клона (клонов) ГСК и его запрограммированной эррадикации (уничтожения) с последующим полным или частичным восстановлением молекулярно-биологической структуры костного мозга (КМ) человека, существовавшей до болезни. Цель ПРКМ – остановка прогрессирования иммуноассоциированных фатальных болезней цивилизации (БЦ) и профилактика их возможных рецидивов и внезапной смерти от них. Цель достигается путем *ex vivo* репаративного биосинтеза (РБС) поврежденных участков ДНК собственных ГСК фармакологической (геномной) модуляцией и коммитированием аутологичных ГСК доминирующего клона (клонов), выделенных из организма пациента и их инкубация с фрагментами двухцепочечными ДНК (дцДНК) здорового донора (лекарственная субстанция «Панаген») в специальных базовых условиях (СБУ) с последующей реинфузией коммитированных ГСК в ПК пациента с БЦ. В результате этих манипуляций в 80-85% ГСК происходит «блокировка» репродуктивных и пролиферативных функций за счет выхода их в терминальную дифференцировку с последующей деградацией и эррадикацией потомков этого клона в течении 3-6 месяцев. Эти ГСК трансформируются из долгоживущих систем ГСК в гемопоэтические предшественники с последующей дифференцировкой и ограниченным сроком жизни (80-120 дней). В 15-20% в ГСК запускается саногенез и самореставрация. Для замещения возникшего количественного дефицита иммунных клеток крови в организме человека происходит естественная активация и размножение эмбрионально заложенных, но ингибированных ранее, здоровых клонов ГСК КМ, находящихся в состоянии покоя (Go фаза). Их самовоспроизводством обеспечивается восстановление исходного состояния (*status quo*) поликлональности гемопоэза человека, существовавших до болезни. ПРКМ приводит к перезапуску системы врожденного иммунитета и формированию новых системных иммунных ответов организма на патологию. Технология может широко применяться при лечении иммуноопосредованных аутоиммунных, нейродегенеративных, онкологических, сердечно-сосудистых и наследственных заболеваниях человека, осложненным КГ, профилактике старения и внезапной смерти.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки, костный мозг, реституция костного мозга, фармакологическая и геномная модуляция, геномное балансирование, трансплантация костного мозга, лекарственная субстанция «Панаген»

КЛОНАЛЬНЫЙ ГЕМОПОЭЗ КАК ОСНОВНАЯ ПРИЧИНА ВОЗНИКНОВЕНИЯ И ПРОГРЕССИРОВАНИЯ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЧЕЛОВЕКА И ПЕРСПЕКТИВНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ СТРАТЕГИЙ ЛЕЧЕНИЯ В РЕГЕНЕРАТИВНОЙ И ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ МЕДИЦИНЕ

А.С. Брюховецкий^{1*}, И.С. Брюховецкий⁴, Л.Ю. Гривцова³, П.А. Шаталов², М.П. Райгородская², М.А. Хакимзянова¹, М.А. Шурдов¹

¹ АО Клинический госпиталь «НейроВита» (г. Москва),

² МНИИО им А.П. Герцена - филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России (г.Москва),

³ МНРЦ им .Ф.Цыба -филиал ФГБУ НМИЦ радиологии Минздрава России (г.Обнинск, Калужской области),

⁴ Медицинский центр ДВФУ (г. Владивосток)

* neurovita-as@mail.ru

Известно, что клональный гемопоэз (КГ) или формирование патологического моно- или олигоклонального кроветворения означает формирование патологического клона (клонов) гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в костном мозге (КМ) и обусловлено накоплением дополнительных соматических мутаций (ДСМ) в ГСК КМ при злокачественных гематоонкологических заболеваниях (лейкозах, лимфомах и др.), старении и сердечно-сосудистых заболеваниях. КГ является главным молекулярно-биологическим механизмом патогенеза этих заболеваний.

Целью работы стало установление неизвестного ранее научного факта существования клонального кроветворения при возникновении и прогрессировании нейродегенеративных болезней (НДБ) человека и проверка научной гипотезы о том, что НДБ инициируются и пролонгируются геномно-протеомным повреждением и формированием патоспецифических клонов собственных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга (КМ). Изучены 20 больных с различными НДБ [болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона (БП), боковой амиотрофический склероз (БАС) и др.], которым был произведен геномный анализ ДНК, выделенной из ГСК КМ и ДНК выделенной из лимфоцитов периферической крови (ПК) методом секвенирования нового поколения (NGS). Было выполнено целевое парноконцевое секвенирование экзома 22 000 генов с целью поиска генетических полиморфизмов, специфичных для НДБ и выявление дополнительных соматических мутаций (ДСМ) в генах клоальности и генах стволовости. Всем пациентам с НДБ было проведено протеомное картирование и профилирование мембранных белков ГСК методом многоцветной проточной цитофлюориметрии, результаты сопоставлялись с собственными данными протеомного картирования и профилирования ГСК у 54 здоровых доноров КМ и 62 больных БАС. Герминогенный полиморфизм, свидетельствующий о наследственном генезе болезни, был выявлен только у одного пациента с НДБ, все остальные заболевания имели спорадический генез. У всех пациентов с прогрессированием НДБ были выявлены грубые повреждения молекулярной структуры мембранных белков ГСК и различные мутации генов клоальности, что свидетельствует о наличии у них клонального гемопоэза (КГ). При этом, сравнение выявленных ДСМ (нуклеотидных замен ДНК) в генах клоальности в ГСК КМ и в лимфоцитах ПК практически были не отличимы у всех пациентов, что свидетельствует о моноклоальности или олигоклоальности кроветворения при прогрессировании НДБ. Было выявлено 123 ДСМ из которых 114 мутаций составили нуклеотидные замены генов клоальности и 9 мутаций генов стволовости. Если общее количество ДСМ генов клоальности принять за 100%, то у больных с НДБ было выявлено 18 типов мутаций гена клоальности *AKT1* (16,5%), 16 типов мутаций гена *ASXL1* (14,67%), 20 типов мутаций гена *CBL* (18,3%), 17 типов мутаций гена *JAK2* (15,6%), 12 типов мутаций гена *PTEN* (11%), 1 тип мутаций гена *PPM1D* (0,9%), 10 типов мутаций гена *TET2* (9,2%), 12 типов мутаций гена *TP53* (11%), 2 типа мутаций гена *DNMT3A* (1,8%), 3 типа мутаций гена *DNMT3b* (2.75%) и 1 тип мутаций гена *DNMT1* (0,9%). При этом мутаций генов стволовости отмечено немного: 6 типов мутаций гена *NANOG* и 3 типа мутаций гена *MTOR*. Было показано, что ДСМ при НДБ структурно отличаются от ДСМ при старении, что говорит о молекулярно-генетическом различии этих возрастзависимых болезней. Блокирование клонального гемопоэза может стать новой стратегией лечения и остановки прогрессирования НДБ.

МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ IN VITRO ПЛЕВРАЛЬНЫХ МЕЗОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

Л. М. Гайфулина^{1*}, Н.И. Бакаленко¹, Д. В. Смирнова¹, Д. Е. Ян¹, М.А. Атюков², А.Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

²Городская многопрофильная больница №2

lianagaiullina.ya@yandex.ru

В настоящее время главной задачей в области профилактики и лечения спонтанного пневмоторакса (СП), включая его рецидивы, является тщательное изучение факторов, способствующих этому заболеванию. Известно, что пневмоторакс вызван нарушением целостности висцерального слоя плевры, репаративная регенерация которой в норме происходит с участием мезотелиальных клеток [1]. Таким образом, исследование особенностей клеток мезотелия и их роли в фиброгенезе является важной для поиска потенциальной терапии СП.

Цель исследования - разработать методику выделения и культивирования мезотелиальных клеток из висцеральной плевры пациентов с СП, охарактеризовать полученные мезотелиальные клетки висцеральной плевры методом иммуноцитохимического окрашивания (ИЦХ) и количественной ПЦР.

Мезотелиальные клетки выделяли из первичных клеток висцеральной плевры доноров с СП, полученной в результате частичной резекции легочной ткани. Средний возраст доноров составлял 29±8 лет.

Для выделения мезотелиальных клеток модифицировали описанный в литературе метод [2]. Полученные клеточные суспензии и измельченные ткани высаживались в отдельные культуральные фласки на питательную среду RPMI с добавлением 20% фетальной бычьей сыворотки и 3-кратного антибиотика. Иммунофенотипирование мезотелиальных клеток проводили методом ИЦХ. Клетки окрашивали на маркеры Sox9, E-Cad, PDPN, VE-Cad. Визуализацию и анализ проводили с помощью конфокального микроскопа. Также провели качественную оценку экспрессии промезотелиальных генов при помощи количественной ПЦР.

В результате работы была практически апробирована методика выделения и культивирования мезотелиальных клеток висцеральной плевры. Также было показано, что плевральные мезотелиальные клетки активно экспрессируют мембранный интегральный белок подопланин (PDPN), характеризующийся как маркер эпителиальных клеток и одновременно легочного повреждения. В меньшей степени - E-кадгерин (E-Cad), отвечающий за клеточную адгезию и мезотелиально-мезенхимальный переход, и транскрипционный фактор Sox9, маркер легочного эпителия. Слабее экспрессируются белок клеточной адгезии эндотелия VE-кадгерин (VE-Cad).

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

1. Mutsaers, S. E.; Birnie, K.; Lansley, S.; Herrick, S. E.; Lim, C.-B.; PrÃ[^]ale, C. M. Mesothelial Cells in Tissue Repair and Fibrosis. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*.
2. Metelmann, I. B.; Kraemer, S.; Steinert, M.; Langer, S.; Stock, P.; Kurow, O. Novel 3D Organotypic Co-Culture Model of Pleura. *PLOS ONE* **2022**, *17* (12), e0276978.

СЕЛЕЗЕНКА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ИСТОЧНИК ИНГИБИТОРОВ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ И МИГРИРУЮЩИХ МОНОЦИТОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦИИ ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ 70% РЕЗЕКЦИИ У МЫШЕЙ

Е.А. Ганцова*^{1,3}, П.А. Вишнякова^{1,2}, В.В. Киселева^{1,2}, А.В. Лохонина^{1,2}, А.В. Ельчанинов^{1,3}

1 Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы, 117198, Москва

2 ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова», 117198, Москва

3 Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына ФГБНУ "РНИЦХ им. акад. Б.В. Петровского", 117418, Москва

* gantsova@mail.ru

Изучение роли иммунной системы в регенерации печени является фундаментальной задачей. Селезенка является самым крупным лимфоидным органом у млекопитающих. Тесная связь между двумя органами через воротную вену обеспечивает доставку цитокинов селезенки и живых клеток в печень [1,2]. Целью работы стала оценка экспрессии генов, связанных с воспалением, и динамика популяций моноцитов-макрофагов и лимфоцитов селезенки во время восстановления после 70% резекции печени (гепатэктомии) у мышей.

В исследовании использовалась ранее описанная мышьяная модель резекции 70% объема печени [3]. Животных выводили через 24 часа, 72 часа или 7 дней после вмешательства, и селезенки собирали для анализа: транскриптомный анализ Clariom™ S, иммуногистохимический анализ на маркер пролиферации Ki-67 и маркеры макрофагов, а также проточную цитометрию на маркеры лимфоцитов и макрофагов

Потеря и регенерация 70% объема печени повлияли на цитологическую архитектуру и профили экспрессии генов селезенки. Тесты выявили значительное снижение количества клеток Ki 67+ и макрофагов CD115+ в 1-й день, клеток Ly6C+ в 1-й, 3-й и 7-й дни и цитотоксических лимфоцитов CD3+CD8+ в 7-й день. Транскриптомный анализ выявил значительную активацию ингибитора протеазы генов *Serpina3n*, *Stfa2* и *Stfa211* и снижение экспрессии генов-регуляторов клеточного цикла в 1-й день, что отражается в обратной динамике, наблюдаемой на 7-й день. Ранние стадии восстановления печени сопровождаются индукцией определенных противовоспалительных маркеров, а также частичным подавлением генов циклина в селезенке. Популяции лейкоцитов селезенки реагируют на гепатэктомию снижением скорости пролиферации и сдвигом субпопуляционного баланса. Значительное снижение относительного количества клеток CD115+ и F4/80+ в селезенке может указывать на увеличение оттока моноцитов-макрофагов.

Резекция печени вызывает значительные изменения в селезенке, влияя на ее транскриптомные профили и гомеостаз лейкоцитов. Высокие уровни ингибиторов протеаз, о которых свидетельствует повышенная экспрессия соответствующих генов в первый день, могут играть противовоспалительную роль при достижении регенерирующей печени через воротную вену. Популяции лейкоцитов селезенки реагируют замедлением пролиферации. Преходящее снижение локального количества CD115+ и Ly6C+ клеток может свидетельствовать о миграции моноцитов-макрофагов селезенки в печень.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского Научного Фонда № 22-14-00152.

1. Tarantino G., Scalera A., Finelli C. Liver-spleen axis: intersection between immunity, infections and metabolism //World journal of gastroenterology: WJG. – 2013. – Т. 19. – №. 23. – С. 3534.
2. Li L. et al. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets //Journal of translational medicine. – 2017. – Т. 15. – №. 1. – С. 1-10.
3. Nevzorova Y. A. et al. Partial hepatectomy in mice //Laboratory animals. – 2015. – Т. 49. – №. 1_suppl. – С. 81-88.

СРАВНЕНИЕ ТРАНСКРИПТОМНЫХ И ПРОТЕОМНЫХ ПРОФИЛЕЙ ХОНДРОЦИТОВ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Е.С. Ручко², П.А. Голубинская¹, А.С. Пикина¹, Т.В. Владимирова¹, И.П. Смирнов¹,
В.Д. Гордеева¹, К.М. Климина¹, Г.П. Арапиди¹, А.В. Еремеев^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика
Ю. М. Лопухина, Москва, 119435

² Институт Биологии Развития РАН, Москва, 119334

* Art-eremeev@yandex.ru

Развитие технологий с использованием индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) открывает перед исследователями новые возможности в области регенеративной медицины [1]. В работах, посвященных задаче восстановления структуры гиалинового хряща – ткани, характеризующейся слабым регенеративным потенциалом, применение ИПСК для получения хондроцитоподобных производных является перспективным способом улучшения или замены существующих методик восстановления хряща при различных паталогических состояниях, например, травматическим поражением или артритах различного генеза [2]. Однако, современные протоколы дифференцировки ИПСК в клетки, подобные хондроцитам, являются несовершенными, что ведет к необходимости оптимизации методов с целью увеличения их эффективности, безопасности для дальнейшей применимости при масштабировании.

В данной работе были получены и проанализированы транскриптомные (RNA-seq) и протеомные (LC-MS) профили клеточных культур хондроцитов, выделенных из биоптатов как здоровых доноров, так и пациентов с различными вариантами патологий, а также их 3D клеточных культур – в виде сфероидов. Аналогичные профили были получены для 2D и 3D культур ИПСК и дифференцированных из ИПСК хондроцитоподобных производных.

Было обнаружено, что для нативных хондроцитов, по сравнению с хондроцитоподобными производными ИПСК, характерны повышенные уровни экспрессии генов, участвующих в процессах клеточной адгезии, миграции и организации внеклеточных структур. Среди генов с пониженной экспрессией выявлены гены, вовлеченные в регуляцию пролиферации клеток и процессинг некодирующих РНК. При сравнении ИПСК и хондроцитоподобных дифференцированных производных было выявлено обогащение Wnt и MAPK сигнальных путей, а при сравнении 2D и 3D культур нативных хондроцитов было выявлено обогащение Rap1 сигнального пути, контролирующего такие клеточные процессы как адгезия, полярность и образование межклеточных взаимодействий. Для хондроцитов полученных из биоптатов от пациентов с артрозами характерна активность генов, вовлечённых в механизмы защиты против вирусов, что может указывать на инфекционную природу заболевания, среди представленных образцов.

Полученный массив омиксных данных о хондроцитах различного происхождения и хондроцитоподобных производных ИПСК позволяет выделить ключевые сигнальные пути, что может быть использовано при оптимизации протоколов направленной дифференцировки.

Исследование выполнено в рамках государственного задания ОПОРА-2.

1. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. Vol. 126. P. 663–676.
2. Craft A., Rockel J., Nartiss Y., Kandel R., Alman B., Keller G. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells // Nat Biotechnol. 2015. Vol. 33. P. 638–645.

ОЦЕНКА БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ХОНДРОСФЕР НА ОСНОВЕ ХОНДРОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНОКУЛЯЦИИ ИММУНОДЕФИЦИТНЫМ МЫШАМ

П.А. Голубинская¹, А.С. Пикина¹, Е.С. Ручко², Т.В. Владимирова¹, Е.В. Коженевская³,
А.Д. Поспелов³, А.В. Еремеев^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю. М. Лопухина, Москва, 119435

² Институт Биологии Развития РАН, Москва, 119334

³ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022

* art-eremeev@yandex.ru

В настоящее время в РФ отсутствуют технологии, направленные на патогенетическое лечение повреждений хрящевой ткани. Основным терапевтическим подходом являются препараты на основе противовоспалительных средств, гиалуроновой кислоты/аутологичной тромбоцитарной массы, которые дают кратковременный эффект и небольшую отсрочку операции по замене сустава. Получение 3D-хрящеподобных конструкторов из хондроцитов является перспективным направлением для коррекции объёмных дефектов суставного хряща. В рамках доклинических исследований подобных биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) должны быть оценены биораспределение, характеризующее миграционный потенциал клеток, а также способность генерировать эктопическую хрящевую ткань [1, 2].

Целью данной работы является изучение биораспределения и оценка состоятельности имплантата с помощью гистологического анализа. Данный имплантат в виде хондросфер предназначен для терапии поражений суставного хряща у человека и производится как аутологичный БМКП.

В опытных группах (инокуляция хондросфер) и группах контроля (введение физиологического раствора) было по 24 мыши линии Balb/c nude обоих полов (n=48), которые содержались в условиях SPF-вивария. Мышей взвешивали дважды в неделю, значимых различий по весу животных не выявлено. Через 3 месяца после подкожной инокуляции хондросфер половину особей выводили из эксперимента, органы и ткани животных замораживали для последующего выделения ДНК. Методом ПЦР человеческая ДНК была обнаружена только у мышей в месте закола хондросфер. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии миграции клеток изучаемого БМКП в другие органы и ткани животных. Гистологическое исследование введенных хондросфер проводили с помощью окраски гематоксилином и эозином, альциановым синим, антителами к коллагену I и II типов, агрекану, SOX9, Ki67. В образцах были выявлены все указанные маркеры хрящевой ткани.

Проведённое исследование даёт основания оценивать исследуемые образцы БМКП как безопасные в части биораспределения при сохранении гистологических характеристик хрящевой ткани в зоне инокуляции.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22-15-00250.

1. Erben R.G., Silva-Lima B., Reischl I., Steinhoff G., et al. White paper on how to go forward with cell-based advanced therapies in Europe // Tissue Eng Part A. 2014. Vol. 20. P. 2549–2554.
2. Fickert S, Gerwien P, Helmert B, Schattenberg T, et al. One-Year Clinical and Radiological Results of a Prospective, Investigator-Initiated Trial Examining a Novel, Purely Autologous 3-Dimensional Autologous Chondrocyte Transplantation Product in the Knee // Cartilage. 2012. Vol. 3. P. 27–42.

ВЛИЯНИЕ TGFβ1 НА СООТНОШЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ПОЛУЛЯЦИЙ В СОСТАВЕ *IN VITRO* ПЕРИВАСКУЛЯРНОЙ НИШИ СЕРДЦА – КАРДИОСФЕРАХ

Ю.Д. Гольцева^{1,2*}, К.В. Дергилев¹, А.Д. Гуреев², М.А. Болдырева^{1,3}, Е.В. Парфенова^{1,2},
И.Б. Белоглазова¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова Минздрава России, Москва, 121552

² Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³ Высшая школа экономики, факультет биологии и биотехнологии, Москва, 109028

*eleagnusom@gmail.com

Периваскулярная ниша (ПН) сердца – это микроокружение сосуда, включающее сосудистые прогениторные, эндотелиальные, муральные и стромальные клетки, компоненты базальной мембраны и внеклеточного матрикса. В сердце ПН играет важную роль в поддержании гомеостаза и участвует в репарации за счет активации ангиогенеза. При различных патологиях сердца возрастает уровень трансформирующего фактора роста бета 1 (TGFβ1), однако мало известно о роли TGFβ1 в регуляции ПН сердца. Для изучения действия TGFβ1 на компоненты ПН сердца перспективной 3D клеточной моделью являются кардиосферы (КС), состоящие из мезенхимоподобных, прогениторных и эндотелиальных клеток.

Целью данной работы было оценить влияние TGFβ1 на клетки, формирующие ПН, в составе КС.

Методы. Для формирования КС клетки эксплантной культуры, полученной из сердец мышей линии C57Bl6, высаживали на низкоадгезивные 96-луночные планшеты с U-образным дном (Nunc) по 10 000 клеток на лунку и культивировали 72 ч в среде, содержащей 65% DMEM/F-12, 35% IMDM и 3% сыворотки. Клетки стимулировали при посадке 10 нг/мл TGFβ1 (Elabscience). Сформированные КС замораживали в криосреде для изготовления криосрезов с последующим иммунофлуоресцентным окрашиванием, а также лизировали в RIPA буфере для оценки содержания белка методом иммуноблоттинга. Использовали антитела к CD31 (BD), VE-кадгерин (abclonal), c-Kit (R&D), VEGFR2 (abcam), NG2 (abcam), SMA (abcam), SM22α/трангелин (abclonal), виментин (Biolegend), FN/фибронектин (Cloud-Clone Corp.), COL I/ коллаген I (abclonal), LAM/ламелин (abcam), GAPDH (Cell signaling).

Результаты. TGFβ1 не оказывал влияние на форму и размер формируемых КС (в среднем 307 мкм). В КС, обработанных TGFβ1, наблюдалось уменьшение длины CD31+ микрососудистой сети на 36,27 % и снижался уровень эндотелиального маркера VE-кадгерина в 1,85 раз. TGFβ1 не оказывал влияние на число c-Kit+ прогениторных клеток, однако наблюдалось уменьшение в 2,20 раза VEGFR2+ клеток, которые относят и к сосудистым прогениторным клеткам, и к эндотелиальным, активированным в процессе ангиогенеза. TGFβ1 изменял соотношение муральных клеток: уменьшал число NG2+ клеток (перипитов) в 2.18 раз, увеличивал число SMA+ клеток (гладкомышечных) в 1,38 раз, а также возрастал уровень маркера гладкомышечных клеток трангелина/SM22α в 5,66 раз. Число виментин+ клеток не менялось. Значимых изменений в содержании белков базальной мембраны (LAM) и внеклеточного матрикса (COL I, FN) мы не обнаружили.

Заключение. Таким образом, мы показали, что TGFβ1 способен изменять соотношение клеточных популяций в периваскулярной нише *in vitro*, формируемой на основе кардиосфер. TGFβ1 подавлял формирование микрососудистой сети, что может указывать на его отрицательную роль в поддержании репаративного ангиогенеза в сердце.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 21-15-00327.

ФИБРИЛЛЯРНЫЕ КОЛЛАГЕНОВЫЕ МАТЕРИАЛЫ: ГЕЛИ, ПОЛОТНА, 3D СТРУКТУРЫ

Д.М. Дарвиш^{1,2*}, С.А. Александрова¹, М.А. Финк^{1,3}, А.Р. Титова^{1,3}, Н.А. Михайлова¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, 191186

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

* darvishdi@mail.ru

Разработка новых биомедицинских клеточных продуктов (БМКП) неразрывно связана с использованием биоматериалов, которые не только выполняют функцию носителя для клеток, но также способны влиять и на их функционирование. Коллаген I типа занимает особое место среди биоматериалов, так как именно этот белок составляет основу многих органов и тканей, в которых он представлен в виде сети коллагеновых фибрилл. Именно поэтому воссоздание фибриллярной структуры в материалах, которые служат матрицей для культивирования клеток, может иметь особое значение. Уникальной особенностью коллагена является, то что он способен самособирается в нативные фибриллы в условиях *in vitro*, благодаря чему появляется возможность воссоздавать биологические структуры.

В нашей лаборатории разработаны методы создания фибриллярных коллагеновых материалов в виде гелей, полотен и трехмерных структур. Для создания коллагеновых гелей была подобрана методика с использованием нейтрализующего солевого раствора. Полученные гели представляли собой сеть хорошо связанных коллагеновых фибрилл, в ячейках между которыми удерживается жидкость. Такие гели могут заселяться клетками, а также использоваться для модельных экспериментов в 3D условиях.

На основе гелей были сформированы коллагеновые полотна путем удаления избыточной жидкости методом пластического сжатия. При этом плотность коллагеновых фибрилл и количество влаги в них регулируются условиями сжатия. Полученные коллагеновые полотна могут быть использованы как самостоятельно в качестве раневого покрытия, так и служить носителями для клеток при создании БМКП.

Для придания устойчивости как к механическим, так и к биологическим воздействиям были отработаны методики модификации коллагеновых гелей и полотен карбодимидом (EDC/NHS). Такая обработка повышает жесткость материалов, что значительно упрощает работу с ними при наложении на рану, а также существенно увеличивает устойчивость к биодеградации.

Одним из преимуществ фибриллярных коллагеновых материалов является также и то, что они могут быть наполнены различными агентами, придающими им специальные свойства. Для придания остеоиндуктивных свойств нами были разработаны гели и полотна с добавлением биостекла и фиброина шелка. На основе таких полотен были сформированы объемные 3D структуры, которые стабилизировали действием EDC/NHS.

Все полученные материалы анализировали методом сканирующей электронной микроскопии, механические свойства оценивали в режиме пластического сжатия, об остеоиндуктивных свойствах судили по степени минерализации в модельных биологических средах, а биосовместимость определяли на клеточных тест-системах.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008.

2D- И 3D-КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА
А.Г. Демченко*¹, Е.В. Кондратьева¹, М.В. Балясин², В.Ю. Табаков¹, Е.Л. Амелина³, А.В. Лавров¹, С.А. Смирнихина¹

¹ ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова», Москва, 115478

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Москва, 117198

³ ФГУ НИИ Пульмонологии ФМБА, Москва, 115682

* demchenkoann@yandex.ru

Эксперименты с использованием пациент-специфичных клеточных культур являются необходимым этапом диагностики заболеваний и разработки лекарственных препаратов для лечения всех болезней человека. При этом зачастую некоторые типы клеток сложно получить путем биопсии, например, клетки легких. В настоящей работе в качестве культур клеток эпителия дыхательных путей рассматриваются базальные клетки легкого (БКЛ), бронхиальные и легочные органоиды (БО и ЛО, соответственно), полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) пациентов с муковисцидозом (МВ).

БО, ЛО и БКЛ получали путем дифференцировки ИПСК пациентов с МВ (гомозиготная мутация F508del в гене *CFTR*) и здоровых доноров по ранее отработанным протоколам с некоторыми модификациями [1, 2]. Характеристику клеточного состава БКЛ, БО и ЛО проводили методом иммунофлуоресцентного окрашивания с последующим анализом методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Для оценки функциональной активности *CFTR*-канала в БО и ЛО проводили форсколин-индуцированное набухание (FIS) органоидов. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism.

Получены БО от двух пациентов с МВ и одного здорового донора, ЛО от шести пациентов с МВ и трех здоровых доноров, БКЛ от трех пациентов с МВ и двух здоровых доноров. БО и ЛО экспрессируют маркеры базальных (TP63, СК5), бокаловидных (MUC5AC) и крупных секреторных клеток (SCGB3A2), ЛО также экспрессируют маркеры альвеолоцитов 1 (AQP1) и 2 (SFTPB) типа. БКЛ экспрессируют маркеры базальных клеток (TP63, СК5). При FIS БО и ЛО из ИПСК здорового донора набухали на 24 ч в среднем в 2,5 раз ($p < 0,0001$) и 5,6 раз ($p < 0,0001$) относительно исходного значения, соответственно. БО и ЛО из ИПСК донора с муковисцидозом набухали на 24 ч в среднем в 1,1 раз ($p = 0,598$) и 1,08 раз ($p = 0,685$) относительно 0 ч, соответственно. При FIS ЛО полученных из БКЛ здорового донора набухали на 24 ч в среднем в 1,8 раз ($p < 0,0001$), а из БКЛ пациента с МВ на 24 ч не набухали в ответ на инкубацию с форсколином ($p > 0,05$).

Результаты работы демонстрируют возможность получения мультипотентных базальных клеток легкого, бронхиальных и легочных органоидов из ИПСК, с охарактеризованным клеточным составом. Показана возможность проведения форсколин-индуцированного набухания как на бронхиальных, так и на легочных органоидах, что может быть использовано в дальнейшем для оценки проводимости канала *CFTR*.

1. Hawkins F. J. et al. Derivation of airway basal stem cells from human pluripotent stem cells //Cell Stem Cell. – 2021. – Т. 28. – №. 1. – С. 79-95. e8.

2. Demchenko A. et al. Airway and Lung Organoids from Human-Induced Pluripotent Stem Cells Can Be Used to Assess *CFTR* Conductance //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 7. – С. 6293.

РАЗРАБОТКА КЛЕТОЧНОЗАСЕЛЁННЫХ КОМПОЗИЦИОННЫХ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ.

Ю.А. Домбровская^{1*}, Н.И. Енукашвили^{1,2*}, А.В. Котова^{1,2}, В.В. Багаева², Н.Ю. Семенова³,
С.И. Твердохлебов⁴, Е.М. Приходько², А.В. Силин¹

¹ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, г. Санкт-Петербург

² Центр клеточных технологий «Покровский», г. Санкт-Петербург

³ ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург

⁴ Национальный исследовательский Томский политехнический университет

*- nienewmail@yandex.ru

* - j_dombrowskaja@mail.ru

В настоящее время для восстановления костной ткани используются аддитивные технологии. При всех достоинствах существенным недостатком этих технологий является их непригодность для полноценного восстановления костной ткани. По своей сути, они являются высокотехнологичным персонализированным инструментом для протезирования. Использование резорбируемых нетоксичных каркасов, заселенных клетками, способными к остеогенной дифференцировке, является одним из возможных инструментов для полноценного восстановления костных тканей. Помимо обширных костных дефектов, клеточнозаселенные скаффолды необходимы и ожидаются в стоматологии и пародонтологии при таких заболеваниях как: рецессии десен, хронических формах пародонтитов, атрофических изменениях костной ткани челюстей и т.д. Цель работы: разработка стандартизованных методов выделения и культивирования стволовых клеток пульпы зуба и периодонта, сравнение их биологических свойств и подбор материала скаффолда для оценки возможности применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. В ходе работы разработано два метода получения стволовых клеток пульпы и периодонта: методом нейросфер и методом ферментации, создана коллекция паспортизованных культур ранних пассажей стволовых клеток пульпы постоянных зубов и клеток периодонта. Культуры получены парами – из каждого донорского образца выделяли клетки пульпы и периодонта. Разработана технология 3D печати по данным компьютерной томографии заливочных форм, воспроизводящих дефект альвеолярной кости, для заливки формирования мягких скаффолдов. Подобран материал на основе поликапролактона и гидроксиапатита для 3D. Показано, что клетки сохраняют свои морфофункциональные свойства в составе такого скаффолда. В экспериментах на мышах показано, что приготовленные по данной технологии импланты ускоряют процессы ремоделирования костной ткани. Проведено сравнение экспрессии плюрипотентных, нейроэпителиальных, остеогенных маркёров, а также протеомов для определения биологической эффективности и возможного применения клеток в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Показано, что клетки пульпы, в отличие от клеток периодонта, наиболее пригодны для восстановления костных дефектов ротовой полости, а также зубного дентина. Выбор характера скаффолда определяется целью проводимого лечения. В экспериментах на пу/пу мышах показано отсутствие новообразований в области инъекции стволовых клеток пульпы и периодонта, а также во внутренних органах животных. Таким образом, клеточнозаселенные скаффолды на основе стволовых клеток пульпы или периодонта (в зависимости от цели лечения) являются перспективными с точки зрения разработки БМКП для восстановления костной ткани в стоматологии и ортодонтии.

Исследование выполнено в рамках Государственного Задания

ФОРМИРОВАНИЕ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ: РОЛЬ НЕКОДИРУЮЩИХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ.

Н.И. Енукашвили^{1,2*}, Н.В. Пономарцев¹, А.И. Бричкина³, Р.В. Афанасьев¹, А.И. Соловьева¹, Л.А. Белик^{2,4}, Н.Ю. Семенова⁴, Е.А. Гуща¹, А.О. Травина¹, Д.С. Зилов¹

¹ Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург

² Центр клеточных технологий «Покровский», г. Санкт-Петербург

³ Марбургский Университет Филиппа, Марбург, Германия

⁴ ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, Санкт-Петербург

*- nienewmail@yandex.ru

Опухолевое микроокружение включает в себя сосуды, иммунные клетки, фибробласты, внеклеточный матрикс и сигнальные молекулы внутри опухоли и в прилегающих областях. Клетки опухоли и микроокружения постоянно взаимодействуют между собой, изменяя свои свойства. Фибробласты опухоли происходят из мигрирующих фибробластов, мезенхимных стромальных клеток, эндотелиоцитов, адипоцитов и т.д.). Они устойчивы ко многим видам терапии и могут стимулировать рост остаточных опухолевых клеток и ускорить рецидив заболевания. Для понимания механизмов взаимодействия опухолевых фибробластов и опухолевых клеток необходимо изучение новых типов сигнальных молекул, участвующих в процессе. Известно, что в опухолях часто наблюдается многократное (в 100-1000 раз) усиление транскрипции перицентромерных (пц) ДНК классических сателлитов 2 и 3 (HS2, HS3), функциональное значение которой неизвестно, однако известно, что она всегда ассоциирована с неблагоприятным прогнозом. Цель работы: исследование динамики и функционального значения транскрипции пцДНК в опухолях. Показано на примере одного из гемобластозов (множественной миеломы) и солидной опухоли (аденокарциномы легкого), что на ранних стадиях, а также после терапии, пцДНК HS2, HS3 транскрибируется преимущественно в мезенхимных стромальных клетках (МСК) и фибробластах. В обоих случаях МСК обладали способностью усиливать хеморезистентность опухолевых клеток. В опухолях поздних стадий отмечено высокое содержание транскриптов пцДНК HS2 в собственно опухолевых клетках. Факторы, индуцирующие поляризацию фибробластов по опухоль-ассоциированному типу (TGF β , интерлейкин 1 α , сокультивирование с опухолевыми клетками), индуцировали и экспрессию пцДНК в фибробластах и МСК. Ингибирование транскрипции антисмысловыми нуклеотидами приводило к снижению выраженности проинфламаторного, протуморогенного, опухоль-ассоциированного фенотипа фибробластов. Показана возможность поглощения опухолевыми клетками пцРНК из культуральной среды. При повышении уровня пцРНК в опухолевых клетках после трансфекции их конструкциями, сверхэкспрессирующими пцДНК, наблюдали морфологические изменения и появление маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Блокирование транскрипции пцДНК HS2 снижало уровень экспрессии маркеров эпителиально-мезенхимального перехода. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли пцДНК HS2, HS3 в развитии опухолей: на ранних стадиях пцДНК накапливается в фибробластах и МСК, участвуя в их поляризации по опухоль-ассоциированному типу и стимулируя формирование протуморогенного микроокружения опухоли – опухолевой стромы и внеклеточного матрикса. По мере прогрессии опухоли, транскрипты (экзо- и эндогенные) появляются в опухолевых клетках, стимулируя в них эпителиально-мезенхимальный переход, являющийся одним из первых этапов метастазирования. Таким образом, ассоциация транскрипции пцДНК с плохим прогнозом связана с ролью этих последовательностей в формировании опухолевого микроокружения на ранних этапах и их участием в процессах метастазирования – на поздних стадиях развития опухоли.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования (Соглашение № 075-15-2021-1075).

РОЛЬ ГЕНА *POU5F1* В РЕГУЛЯЦИИ РАБОТЫ ГЕНОМА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ КЛЕТОК

В.В. Ермакова*¹, Е.В. Александрова², А.А. Кузьмин¹, А.Н. Томилин¹

¹ Институт цитологии РАН,

² ФГБОУ ВПО Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики

* v.ermakova@incras.ru

Ген *Pou5f1*, кодирующий транскрипционный фактор Oct4, необходим для поддержания плюрипотентного состояния клеток во время эмбриогенеза. Выживание и нормальное развитие плюрипотентных клеток критически зависят от уровня экспрессии Oct4, как его снижение, так и повышение приводит к немедленной потере плюрипотентного статуса [1]. Недавно было открыто множество ранее неизвестных регуляторных элементов гена *Pou5f1*, среди них обнаружены и промоторы других белок-кодирующих генов [2,3].

На данный момент роль новых элементов в регуляторной сети гена *Pou5f1* не ясна. Вероятно последствия нарушения образуемых регуляторных взаимосвязей, могут отразиться не только на уровне экспрессии самого *Pou5f1*, но и на функции других участников.

Целью данного исследования стало обнаружение функций гена *Pou5f1* в формировании сложного регуляторного ландшафта на разных стадиях плюрипотентности: от наивной к праймированной.

В работе с помощью системы CRISPR/Cas9, была получена клеточная модель, где ген *Pou5f1* с минимальным набором регуляторных элементов (конститутивный промотор, дистальный и проксимальный энхансеры) был помещён в новое генетическое окружение. Одновременно в эндогенной последовательности гена в обоих аллелях была удалена область промотора-первого экзона. В подобной модели ген *Pou5f1* оказывается изолирован от привычных регуляторных взаимосвязей, и становится возможным оценить последствия их отсутствия. При помещении клеток в условия культивирования в наивном состоянии, в полученных клетках, возрастал уровень Oct4. Также клетки не были способны перейти в праймированное состояние плюрипотентности.

Ранее было показано, что переход ПСК из наивного состояния в праймированное обусловлен прежде всего переключением активности проксимального и дистального энхансеров [4]. Однако теперь встаёт вопрос о том, какие ещё изменения структуры генома вовлечены в регуляцию гена *Pou5f1* при переходе на разные стадии плюрипотентности.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28.09.2021).

1. Niwa, H., J.-i. Miyazaki, and A.G. Smith, *Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells*. Nature genetics, 2000. **24**(4): p. 372-376.
2. Diao, Y., et al., *A tiling-deletion-based genetic screen for cis-regulatory element identification in mammalian cells*. Nature methods, 2017. **14**(6): p. 629-635.
3. Canver, M.C., et al., *A saturating mutagenesis CRISPR-Cas9-mediated functional genomic screen identifies cis-and trans-regulatory elements of Oct4 in murine ESCs*. Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(47): p. 15797-15809.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕРМАЛЬНОГО ЭКВИВАЛЕНТА ПРИ ЛЕЧЕНИИ ПОСТРАДАВШИХ С ОБШИРНЫМИ ОЖОГАМИ КОЖИ

Е.В. Зиновьев^{1,2,*}, Д.В. Костяков^{1,3}, Д.О. Вагнер^{1,4}, Э.К. Дерий¹, А.Г. Васильева²

¹ ГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт скорой помощи имени И.И. Джанелидзе», Санкт-Петербург, 199106

² ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», Санкт-Петербург, 194100

³ ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, 199034

⁴ ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова», Санкт-Петербург, 195067

evz@list.ru

Оказание медицинской помощи пострадавшим с обширными ожогами кожи является одной из наиболее сложных задач системы здравоохранения не только в нашей стране, но и во всем мире. Показатель летальности при ожогах более 50% поверхности тела может достигать 52%. При этом раннее хирургическое лечение зачастую приводит к неудовлетворительным результатам, а консервативная тактика сопровождается выраженной аутоинтоксикацией, вторичным присоединением патогенной полирезистентной внутрибольничной микрофлоры с последующим септическим течением ожоговой болезни. Одним из путей решения данной проблемы является трансплантация биомедицинских клеточных продуктов на основе различных клеточных популяций: фибробластов, кератиноцитов, мезенхимных стволовых клеток. Их аппликация ускоряет регенерацию пограничных ожогов, подготовку ран к хирургическому лечению, а также улучшает результаты кожной пластики с применением расщепленных, перфорированных аутодермотрансплантатов. Активное внедрение возможностей регенеративной медицины в практику позволило значительно улучшить результаты лечения пострадавших с ожоговой травмой. С 2016 года в ожоговом центре ГБУ СПб НИИ СП им. И.И. Джанелидзе было выполнено более 100 трансплантаций дермального эквивалента на основе аллофибробластов на ожоговые раны, в т.ч. в комбинации с аутодермотрансплантацией, а также пересадкой на донорские участки. Установлено, что аппликация клеточной культуры аллогенных фибробластов на пограничные (дермальные) ожоговые раны позволило добиться их полной эпителизации уже на 12 сутки после травмы, что на 45% ($p < 0,05$) быстрее относительно традиционных методов лечения таких ран. Комбинирование клеточной терапии в сочетании с аутодермотрансплантацией способствовало полной эпителизации перфорационных ячеек уже на 3 сутки наблюдения, что в 2 раза быстрее относительно бесклеточного их ведения. При этом трансплантация дермального эквивалента увеличивала эффективность кожной пластики, которая проявлялась в полном приживлении аутодермотрансплантата и отсутствии участков их лизиса/отторжения. Частота послеоперационных осложнений также была минимальной в группе пациентов с клеточной терапией.

Таким образом, использование возможностей регенеративной медицины является одним из перспективных путей решения проблемы лечения пострадавших с обширными ожогами кожи. Внедрение биомедицинских клеточных продуктов на основе аллогенных фибробластов, обладающих широкими показаниями к применению, позволяет значительно улучшить результаты оказания медицинской помощи тяжелообожженным.

МСК: РЕГЕНЕРАТИВНАЯ МЕДИЦИНА И ОНКО(БЕЗ)ОПАСНОСТЬ. ОБЗОР.

Д.А. Иволгин¹, Д.А. Кудлай²⁻⁴

¹ Центр Клеточных Технологий «Покровский», Санкт-Петербург, 199026

² АО «ГЕНЕРИУМ», Москва, 124460

³ ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, 119048

⁴ ФГБУ «Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства», Москва, 115522

*ida59m@mail.ru

История клинического применения мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток (МСК) насчитывает уже несколько десятилетий. Причём знания о механизмах действия МСК претерпели значительную эволюцию с момента их открытия. С первых попыток использовать замечательные свойства МСК в восстановлении функций органов и тканей встал важнейший вопрос – насколько безопасным будет их применение?

Одним из аспектов безопасности применения такого биоматериала являются туморогенность и онкогенность. Как показали многочисленные исследования, те механизмы, при помощи которых МСК реализуют свой регенеративный потенциал, могут, в принципе, оказывать стимулирующее действие и на клетки опухоли.

В данном обзоре представлены частные механизмы, оказывающие потенциально проопухолевое действие, к которым можно отнести хоуминг МСК в место опухоли, поддержка репликативного и пролиферативного сигналинга как раковых клеток, так и стволовых раковых клеток, ангиогенез, воздействие на эпителиально-мезенхимальный переход.

Наряду с проопухолевыми описаны и механизмы возможного противоопухолевого действия – прямое подавление роста опухоли, нагрузка и транспортирование химиотерапевтических агентов, онколитических вирусов, генетические модификации для таргетирования рака, доставка в опухоль «генов самоубийства».

Поэтому для понимания механизмов взаимодействия МСК–опухоль необходимы исследования как для обеспечения безопасности регенеративной терапии, основанной на использовании клеточных продуктов, так и для создания новейших методов лечения. В данной работе приведен обзор проводящихся в настоящее время клинических испытаний МСК в качестве противоопухолевых средств при злокачественных новообразованиях различной локализации (желудочно-кишечный тракт, легкие, яичники).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ-МАРКЕРОВ АДРЕНАЛЬНЫХ ПРОГЕНИТОРОВ С ПОМОЩЬЮ АНАЛИЗА ДАННЫХ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПТОМА ЕДИНИЧНЫХ КЛЕТОК НАДПОЧЕЧНИКА МЫШИ

С.А. Казиахмедова¹, О.В. Глазова¹, П.Ю. Волчков¹

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), г. Москва, 115184
skaziahmedova@gmail.com

Надпочечники - важный эндокринный орган, производящий кортикостероиды и катехоламины. Патологии, приводящие к снижению эндогенного производства всех или некоторых надпочечниковых гормонов, зачастую обусловлены мутациями в генах белков, отвечающих за различные этапы их синтеза. Одним из самых распространенных нарушений подобного типа является врожденная дисфункция коры надпочечников (ВДКН), вызванная мутациями гена *CYP21A2* (*Cyp21a1*). Для подобных заболеваний активно развиваются терапевтические подходы, основанные на клеточной и генной терапиях. В свою очередь эти подходы требуют более глубокого понимания гомеостаза органов и тканей. Стволовые клетки надпочечников (адренкортикальные прогениторы, АКП) происходят из мезодермальных стволовых клеток и во взрослом органе локализируются преимущественно в капсуле. Выявление белков, специфичных для АКП, является важной задачей. В данной работе предлагается решение этой задачи с использованием анализа данных секвенирования транскриптома единичных клеток (SC-Seq) [1] надпочечников мыши. Нами был отработан протокол подготовки суспензии единичных клеток и алгоритм биоинформатического анализа полученных данных. Для выделения клеточных популяций были использованы известные на текущий момент маркеры мышинных мезенхимальных стволовых клеток, адренальных прогениторов и стероидогенных клеток [2].

В результате анализа было выявлено 14 популяций клеток коры надпочечников мышей линии CD1, в том числе клетки-прогениторы, со следующими маркерами: *Mdk*, *Itih5*, *Gas5*. Помимо этого, было определено несколько переходных состояний с помощью анализа скоростей РНК, в частности переход клеток-прогениторов в активную пролиферацию.

Работа выполнена в рамках государственного задания (Соглашение от 13.01.2023 № 075-03-2023-106.)

1. Chen Geng, Ning Baitang, Shi Tieliu, Single-Cell RNA-Seq Technologies and Related Computational Data Analysis, *Frontiers in Genetics* V10, 2019, p317,

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fgene.2019.00317>, DOI=10.3389/fgene.2019.00317,

ISSN=1664-8021

2. Walczak EM, Hammer GD. Regulation of the adrenocortical stem cell niche: implications for disease. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(1):14-28. doi:10.1038/nrendo.2014.166

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИФИБРОТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМНЫХ КЛЕТОК ВОЛОСЯНОГО ФОЛЛИКУЛА

Е.П. Калабушева*, А.С. Рябченко, Е.А. Воротеляк.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334.

Kalabusheva.e@gmail.com

Трансплантация волосяных фолликулов (ВФ) в область гипертрофического рубца стимулирует его регрессию, включающую в себя ремоделинг коллагеновых волокон, восстановление эпидермальных гребней, васкуляризацию и т.д. [1] Неогенез ВФ при регенерации острой раны у мышей препятствует формированию шрама, стимулируя адипогенную дифференцировку пула миофибробластов [2]. Данные работы указывают на перспективность трансплантации ВФ для стимуляции нормального ранозаживления и предотвращения формирования гипертрофических рубцов. Недостатками такой терапии является необходимость использования аутологичных ВФ, что связано с дополнительной травматизацией кожи пациента, а также невозможность их криоконсервации и длительного последующего хранения. Мезенхимный компартмент ВФ, дермальная папилла, содержит популяцию морфогенетически-активных клеток, успешно воспроизводящихся в культуре, сохраняющих свой морфогенетический потенциал в течение нескольких пассажей, проходящих цикл криоконсервации и последующей разморозки. Мы оценили, обладают ли клетки дермальной папиллы ВФ человека способностью снижать экспрессию фибротических маркеров у клеток, изолированных из гипертрофических рубцов, *in vitro*.

Биоптаты келоидного рубца были получены с информированного согласия доноров в ФГБУ «НМИЦ ВМТ им. А.А. Вишневого» МО РФ. В сравнении с фибробластами здоровой кожи человека фибробласты келоида имели повышенную экспрессию профибротических маркеров, более выраженную способность contracting коллагеновый гель и бóльшую склонность к адипогенной дифференцировке. Таким образом, фибробласты рубца являются релевантной моделью для исследования антифибротического потенциала.

Келоидные фибробласты культивировали в системе «TransWell» в присутствии клеток дермальной папиллы волосяного фолликула человека. Мы обнаружили статистически значимое повышение экспрессии коллагена III при кокультивировании с клетками дермальной папиллы, что косвенно указывает на восстановление нормального фенотипа у келоидных фибробластов, однако для других анализируемых маркеров (α SMA, SM22 α , TGF β и др.) мы не обнаружили статистически значимых изменений в экспрессии. Наши результаты показывают, что монокультуры клеток дермальной папиллы недостаточно для предотвращения формирования рубцовой ткани. Комбинирование клеток дермальной папиллы с эпидермальными кератиноцитами приводит к образованию органоидов со свойствами развивающихся фолликулов [3], что может в том числе воспроизводить антифибротические свойства ВФ. Этот подход будет использован нами в дальнейшей работе.

Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение 075-15-2021-1063 от 28.09.2021 г.

1. M. Plotczyk *и др.*, «Anagen hair follicles transplanted into mature human scars remodel fibrotic tissue», *Npj Regen. Med.*, т. 8, вып. 1, Art. вып. 1, янв. 2023, doi: 10.1038/s41536-022-00270-3.
2. M. V. Plikus *и др.*, «Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing», *Science*, т. 355, вып. 6326, сс. 748–752, фев. 2017, doi: 10.1126/science.aai8792.
3. E. Kalabusheva, V. Terskikh, и E. Vorotelyak, «Hair Germ Model In Vitro via Human Postnatal Keratinocyte-Dermal Papilla Interactions: Impact of Hyaluronic Acid», *Stem Cells Int.*, т. 2017, с. 9271869, 2017, doi: 10.1155/2017/9271869.

РАЗРАБОТКА EX VIVO МОДЕЛИ ПАТОЛОГИЧЕСКОЙ КАЛЬЦИФИКАЦИИ АОРТАЛЬНОГО КЛАПАНА ЧЕЛОВЕКА

О. С. Качанова^{1*}, Н. В. Боярская¹, П. М. Докшин¹, А. Б. Малашичева¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341

kachanovaos15@gmail.com

Вопрос разработки лекарственной терапии против патологической кальцификации аортального клапана остаётся открытым в связи с отсутствием эффективных стратегий лечения, за исключением хирургической коррекции и симптоматической терапии. Поиск моделей для исследования безопасности и эффективности антикальцифицирующих препаратов требует от них не только валидности по отношению к условиям *in vivo*, но и гибкости в отношении применимых для нее молекулярно-генетических исследований.

Модель *ex vivo* обладает такими преимуществами, как возможность оценить действие препарата на клетках человека, сохраняя исходную структуру клапана и, следовательно, взаимодействия в нём различных клеточных популяций, в том числе не делящихся. Нами было проведено культивирование клапанов пациентов с кальцинирующим аортальным стенозом, полученных после проведения операций по их протезированию.

Для культивирования использовалась среда, описанная в статье А. Zibirnyk (2020): среда DMEM с низким содержанием глюкозы, 2% FBS, 50 мкг/мл гентамицина, 50 нг/мл инсулин-трансферрин-селен. Смена среды проводилась два раза в неделю, длительность эксперимента 8 недель, клапаны находятся в среде с 5% CO₂ при 37°C. Индукция остеодифференцировки: 10 мМ бета-глицерофосфата, 0,1 мкМ дексаметазона и 50 мкМ аскорбиновой кислоты [1].

Ранее нами проводилось исследование эффективности ингибитора сигнального пути Notch против патологической кальцификации культур интерстициальных клеток аортального клапана [2]. На модели *ex vivo* была произведена оценка действия кренигестата на остеогенную дифференцировку. В дистиллированную воду были помещены гомогенизированные клапаны и после центрифугирования раствор был окрашен коммерческим набором Olvex для спектрофотометрической оценки содержания кальция.

Были получены статистически значимые значения оптической плотности ($p = 0,0317$) в дифференцировке между контролем и пробами с 500 нМ кренигестата.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022)

1. Zibirnyk A, Perez M del M, Blasco M, et al. A Novel Ex Vivo Model of Aortic Valve Calcification. A Preliminary Report. *Front Pharmacol* 2020; 11: 568764. doi:10.3389/FPHAR.2020.568764/BIBTEX.
2. Lobov AA, Boyarskaya N V., Kachanova OS, et al. Crenigacestat (LY3039478) inhibits osteogenic differentiation of human valve interstitial cells from patients with aortic valve calcification *in vitro*. *Front Cardiovasc Med* 2022; 9: 969096. doi:10.3389/FCVM.2022.969096/BIBTEX.

ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕТОМА И УЛЬТРАСТРУКТУРЫ МСК ЧЕЛОВЕКА В 2D И 3D КУЛЬТУРЕ

Н.В. Кошелева^{1,2*}, М.А. Пешкова¹, А.А. Корнеев¹, Д.П. Ревокатова¹, Т.В. Липина³,
И.И. Власова¹, Т.О. Ключев¹, А.И. Шпичка^{1,3}, П.С. Тимашев^{1,3}

¹ Научно-технологический парк биомедицины ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), г. Москва 119048;

² ФГБНУ “НИИ общей патологии и патофизиологии”, г. Москва 125315;

³ ФГБУ ВО МГУ имени М.В.Ломоносова, г. Москва 119991.

*e-mail: kosheleva_n_v@staff.sechenov.ru

Мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) из различных источников и активно применяют в клеточной терапии, тканевой инженерии, регенеративной медицине. Их ультраструктурные изменения и паракринная активность, влияющая на регенеративный и противовоспалительный потенциал, сильно зависят как от источника клеток, так и от условий культивирования. Так, культивирование в 3D условиях с формированием компактных сфероидов способствует синтезу внеклеточного матрикса и влияет на паракринную активность клеток. Целью данной работы стал анализ ультраструктуры и секреторма МСК из различных источников при различных условиях культивирования.

МСК из костного мозга, подкожной жировой ткани, слизистой оболочки ротовой полости, плаценты и основного вещества пупочного канатика (МСК-ПК), культивировали в стандартных условиях – 37°C, 5% CO₂. В 2D условиях использовали монослой 4-ого пассажа, 3D культуры - сфероиды получали из 150 мкл суспензии с концентрацией 3×10⁶ кл/мл на неадгезивных агарозных планшетах. Для анализа ультраструктуры фиксировали в 4% растворе глутарового альдегида (+4°C, 12 ч), дофиксировали 1% раствором OsO₄ (1 ч), обезвоживали, заключали в эпон, получали ультратонкие срезы, которые контрастировали растворами уранилацетата и ацетата свинца по Рейнольдсу и анализировали с помощью просвечивающих электронных микроскопов JEM-100B и JEM-JEOL. Экспрессию цитокинов и хемокинов анализировали с применением мультиплексного анализа и набора Milliplex от 2.5×10⁵ кл/мл. Макрофаги изолировали из моноцитов периферической крови человека, влияние кондиционированных МСК сред на их поляризацию оценивали через 48ч с применением ИФА.

В 2D условиях клетки имели характерный фибробластоподобный фенотип, множество выростов цитоплазматической мембраны, крупное ядро с одним или несколькими ядрышками смещено к одному из полюсов. Митохондрии чаще локализовались возле эндолизосом и ядер, их размер и форма варьировали от небольших овальных до длинных вытянутых. В цитоплазме развит везикулярный компартмент. В сфероидах клетки имели преимущественно округлую или овальную форму, меньший размер, ядра неправильной формы с выростами. Митохондрии в основном небольших размеров, круглой или овальной формы. В цитоплазме 3D культур субкомпаратмент плотных эндолизосом был представлен больше, чем в 2D условиях, а мелкие субкортикальные везикулы встречались реже. У сред, кондиционированных МСК-ПК, был самый высокий уровень паракринной активности в 2D и 3D культурах, причем концентрации IL-8, GRO, IL-6, MCP-1, G-CSF, превышали 1 нг/мл. Несмотря на преобладание провоспалительных цитокинов секретом МСК-ПК из 2D и 3D культур стимулировал поляризацию макрофагов в противовоспалительный M2 фенотип с активацией экспрессии их маркера CD206 и подавлением экспрессии маркирующего M1 макрофаги TNF-α.

Таким образом, 2D и 3D культуры МСК-ПК человека перспективны для терапии и разработке бесклеточных препаратов с выраженной противовоспалительной активностью.

Исследование в Сеченовском Университете было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации в рамках соглашения №075-15-2021-596.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

Н.А. Красковская^{1,3,*}, П.С. Парфенова^{1,2}, А.О. Малыгина¹, М.Г. Хотин¹, Н.А. Михайлова¹

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, Россия;

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

³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Россия.

*e-mail: ninakraskovskaya@gmail.com

Болезнь Хантингтона (БХ) является генетическим аутосомно-доминантным заболеванием, вызванным увеличением количества СAG-повторов в гене хантингтина (НТТ). Продуктом гена является мутантный белок хантингтин, формирующий агрегаты, что приводит к нарушению функциональной активности нейронов и изменению их морфологии. По неизвестной причине у пациентов поражается преимущественно область стриатума. Локализация патологических изменений осложняет изучение механизмов, лежащих в основе заболевания. В связи с чем основной идеей данной работы является создание клеточной модели БХ, основанной на прямой дифференцировке фибробластов пациентов в нейрон-подобные клетки, которые сохраняют все основные возрастные аспекты заболевания.

При помощи технологии прямого репрограммирования, основанного на применении микроРНК и транскрипционных факторов MYT1L, DLX2 и STIP2, были получены индуцированные нейроны стриатума (ИНС) от 3 пациентов с БХ и от 3 здоровых доноров соответствующего пола и возраста. В ИНС, полученных из фибробластов пациентов с БХ, наблюдаются агрегаты мутантного хантингтина, что является основным гистопатологическим признаком данной нейропатологии. Однако количество клеток, содержащих такие внутриклеточные агрегаты, составляет менее 5%. Индуцированные нейроны, полученные из фибробластов пациентов с БХ, также характеризуются измененной морфологией, выражающейся в снижении количества первичных отростков, общего количества отростков, длиной дендритов и разветвленностью дендритного дерева. Кроме того, по сравнению с контролем, в индуцированных нейронах из фибробластов пациентов с БХ наблюдается снижение мембранного потенциала митохондрий, что свидетельствует о снижении активности метаболизма в митохондриях.

Таким образом, разрабатываемая клеточная модель отражает основные патологические изменения, происходящие в нейронах при развитии БХ и может быть применена в качестве платформы для оценки эффективности потенциальных лекарственных препаратов на доклинических этапах исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ №22-75-00106.

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ОПУХОЛЬ-ИНФИЛЬТРИРУЮЩИХ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РАКЕ ЛЕГКОГО

Ю.В. Круглова^{1,2,*}, Г.М. Юсубалиева^{2,3}, В.П. Баклаушев^{1,2,3}

¹ ФГБУ “НИИ Пульмонологии” ФМБА России, Москва, 115682

² ФГБУ “Федеральный Центр Мозга и Нейротехнологий” ФМБА России, Москва, 117513

³ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов ФМБА России, Москва, 115682

*1759317593@mail.ru

Рак легкого остается ведущей причиной смертности от онкологии во всем мире (18,4% от общего числа смертей от рака), вызывая значительное социальное бремя и экономические потери [1]. Несмотря на недавние достижения в стандартных методах лечения прогноз остается крайне неблагоприятным. Иммунотерапия опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами (ОИЛ) это перспективный и альтернативный метод лечения в онкологии, при котором популяция ОИЛ выделяют из стромы опухоли, расширяют *ex vivo* и повторно вводится пациенту. Для рака легкого характерна высокая мутационная нагрузка и выраженное иммуносупрессивное микроокружение, что делает его подходящим кандидатом для терапии ОИЛ. В литературе описаны несколько случаев эффективного использования ОИЛ [2]. Новые фундаментальные исследования необходимы для изучения эффективности и безопасности использования ОИЛ.

Цель исследования — получить панель опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (ОИЛ) из операционного материала рака легкого человека, изучить популяционный состав и оценить противоопухолевую цитотоксичность активированных ОИЛ на монослое аутологичных опухолевых клеток и на модели опухолевых сфероидов.

Материалы и методы. Фрагменты опухоли рака легкого получали из операционного блока ФГБУ «ФНКЦ ФМБА России». Аутологичную пару опухолевых клеток и ОИЛ получали путем механического измельчения опухоли и высевания на адгезивных пластик в ростовой среде DMEM/12 и IMDM. Клетки инкубировали в газовом инкубаторе при 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ и влажности 90%. Популяционный состав ОИЛ определяли методом проточной цитометрии на приборе MACS Quant16. Оценка цитотоксичности выделенных ОИЛ на модели клеточного монослоя проводили с помощью клеточного анализатора RTCA Icelligence, на модели опухолевых сфероидов на приборе Invitrogen EVOS M7000 Imaging System.

Результат. Из интраоперационного материала удалось получить первичную культуру опухолевых клеток рака легкого и ОИЛ. Иммунофенотипирование показало, что выделенные ОИЛ представлены гетерогенной смесью иммунных клеток, содержащих субпопуляции CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, В-лимфоцитов, Т-регуляторных клеток, НК клеток, дендритных клеток. На 2D модели клеточного монослоя и 3D модели опухолевых сфероидов была проведена оценка цитотоксичности активированных ОИЛ. Отрабатываются методы моделирования ксенографтов на иммунодефицитных мышцах линии NSG-GMS3.

Выводы. Полученные результаты могут лечь в основу новых технологий адоптивной иммунотерапии рака легкого за счет преодоления иммуносупрессивного микроокружения и усиления противоопухолевой активности.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 21-74-20110

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics 2022. CA Cancer J Clin. 2022;72(1):7–33. doi: 10.3322/caac.21708.

2. Creelan BC, Wang C, Teer JK, Toloza EM, Yao J, Kim S, Landin AM, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte treatment for anti-PD-1-resistant metastatic lung cancer: a phase 1 trial. Nat Med. 2021; 27(8):1410-1418. doi: 10.1038/s41591-021-01462-y.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ ТРЕХМЕРНОЙ МОДЕЛИ ОПУХОЛИ: ПЕРСПЕКТИВЫ ДЛЯ БОЛЕЕ ЭФФЕКТИВНОГО ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМОВ ОПУХОЛЕВОГО РОСТА И АНГИОГЕНЕЗА

С.М. Кузнецова^{1,3*}, В.А. Кальсин¹, М.Л. Шувалова², Д.А. Гурский², В.П. Баклаушев^{1,2},
М.С. Друцкая⁴, Г.М. Юсубалиева^{1,2,4}

¹Федеральный научно-клинический центр специализированных видов ФМБА России, Москва, 115682

²ФГБУ Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, 117513

³ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), ул. Трубевская, д. 8, стр. 2, Москва, 119991

⁴Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991

kuznetsovasm54@outlook.com

Активность неоангиогенеза оказывает существенное влияние на инвазивный потенциал глиобластомы [1]. Актуальность проекта посвящена взаимодействию эндотелиальных клеток с клетками глиобластомы: изменения паттерна экспрессии генов в церебральных эндотелиоцитах, их барьерных свойств и клетках микроокружения в процессе опухолевого роста [2]. В последнее время появились публикации, отрицающие роль ангиогенеза в глиоме как предиктора развития опухоли. С целью понимания путей взаимосвязи ангиогенеза и опухолевого роста, создали трехмерные модели сложных сфероидов либо дополнительно трансдуцированных, либо липофильно меченых флюоресцентными трейсерами и успешно имплантировали в мозг иммунодефицитных мышей. Сфероиды получали в процессе сокультивирования глиомных клеток, полученных из первичного материала пациентов ФНКЦ ФМБА и ФЦМН ФМБА (одобрение ЛЭК ФНКЦ ФМБА И ФЦМН ФМБА) и свежеприготовленных HUVES (договор с роддомом №4 от 2020 г) в различном соотношении на низкоадгезивных планшетах. В динамике оценивали свойства сфероидов и их пролиферативную активность в лунке с помощью прибора CellInsight CX7 LED Pro HCS Platform. Динамика поведения клеток внутри сфероида отслеживали по флюоресцентной метке с помощью приборов EVOS M7000 Imaging System. Наблюдали появление экспрессии в HUVES белков плотных контактов, характерных для церебрального эндотелия. В свою очередь, отметили увеличение пролиферативного потенциала глиомных клеток в сфероиде в комбинации с HUVES *in vivo*. В сравнении с простым сфероидом (10-12 дней), длительность функционирования сложных ксенографтов в головном мозге возросла в 2-3 раза до 21 недели, с характерными признаками прогрессии по данным МРТ (ClinScan 7T, Bruker Biospin, Germany). Таким образом, исследование и разработка трехмерной модели опухоли представляет большой потенциал для прогресса в борьбе с раковыми заболеваниями.

Работа выполнена в рамках гранта РНФ (№22-64-00057) и ГЗ ФМБА России («Персонализированная платформа для постоперационной иммунотерапии глиобластом»)

1. Tatla AS, *et al.* A vascularized tumoroid model for human glioblastoma angiogenesis. Sci Rep. 2021 Oct 1;11(1):19550. doi: 10.1038/s41598-021-98911-y. PMID: 34599235; PMCID: PMC8486855.

2. Ahn J, Kim DH, Koo DJ, Lim J, Park TE, Lee J, Ko J, Kim S, Kim M, Kang KS, Min DH, Kim SY, Kim Y, Jeon NL. 3D microengineered vascularized tumor spheroids for drug delivery and efficacy testing. Acta Biomater. 2023 Jul 15;165:153-167. doi: 10.1016/j.actbio.2022.10.009. Epub 2022 Oct 13. PMID: 36243378.

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ГИДРОГЕЛЕВОГО БИОПОЛИМЕРНОГО СКАФФОЛДА С МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ

Д.Д. Линькова*¹, М.Н. Егорихина¹, Ю.П. Рубцова¹, И.Н. Чарыкова¹, Д.Я. Алейник¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Приволжский исследовательский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Нижний Новгород, 603005

linckovadaria@yandex.ru

Высокая потребность в продуктах тканевой инженерии не подлежит сомнению. В то же время клиническое применение биоинженерных конструкторов существенно ограничено их коротким сроком жизни. Длительное хранение путём криоконсервации позволит снять это ограничение, облегчив широкое распространение и коммерциализацию. Однако многокомпонентный состав большинства тканеинженерных продуктов значительно усложняет подбор протокола криоконсервации и критериев оценки качества после размораживания. Наше исследование направлено на разработку протокола криоконсервации оригинального гидрогелевого скаффолда с инкапсулированными мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) и выработку комплекса критериев оценки качества и его функциональной активности.

Скаффолды формировали в условиях ферментативного гидролиза с использованием криопреципитата плазмы крови человека и коллагена I типа, в процессе формирования в состав композита вводили МСК. В первой части исследования скаффолды замораживали согласно разработанному протоколу и хранили при температуре -80°C на протяжении 3, 6, 9 и 12 месяцев. После криохранения оценивали внешнее состояние скаффолдов, количество и жизнеспособность клеток. Во второй части исследования скаффолды замораживали с использованием двух видов криоконтейнеров и хранили при температуре -40°C и -80°C . После криохранения кроме внешнего состояния скаффолдов, жизнеспособности и пролиферативной активности клеток также оценивали морфологию клеток при культивировании и их секреторную активность.

Апробированный протокол криохранения гидрогелевого биополимерного скаффолда с мезенхимальными стволовыми клетками позволяет сохранять скаффолд в течение трех месяцев при температуре -80°C с поддержанием клетками высокой жизнеспособности и пролиферативной активности. Было показано, что оптимальным является криохранение при температуре -80°C в криоконтейнере, обеспечивающим плавное снижение температуры при замораживании в течении не менее трех часов до достижения целевых значений температурного режима криохранения. После размораживания обязателен период так называемой акклиматизации. Мы предлагаем проводить акклиматизацию скаффолдов в течение не менее 24 часов после размораживания, культивируя их в стандартных условиях. Показано, что оценка комплекса показателей, включая жизнеспособность, морфологию, пролиферативную и секреторную активность клеток, позволяют дать характеристику качеству биоинженерного конструктора после его вывода из криоконсервации, а также оценить эффективность протокола криохранения.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках Госзадания № 121022500010-6 (ЕГИСУ).

ВЛИЯНИЕ LPA И Y-27632 НА УРОВЕНЬ ГЛУТАТИОНА В КЛЕТКАХ MSCWJ-1 НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ РЕПЛИКАТИВНОГО СТАРЕНИЯ

А.В. Лукачева¹, Г.Г. Полянская¹, Д.Е. Бобков^{1*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

bobkov@incras.ru

В процессе длительного культивирования мезенхимные стволовые клетки (МСК) человека подвержены репликативному старению (РС), которое может серьезно ухудшить их функции как *in vitro*, так и *in vivo* [1]. Поэтому понимание молекулярных процессов, сопровождающих РС МСК, имеет решающее значение для применения МСК в регенеративной медицине. Активные формы кислорода (АФК) в физиологических концентрациях регулируют пролиферацию и дифференцировку МСК, однако избыточное накопление АФК вызывает окислительный стресс и приводит к патологическим последствиям для клеток. Для защиты от избыточных АФК клетки синтезируют восстановленный глутатион (GSH), при этом в процессе РС в МСК происходит значительное снижения уровня GSH [2]. Малые ГТФазы Rho-семейства регулируют окислительно-восстановительное состояние клеток, контролируя ферменты, которые генерируют и преобразуют АФК [3]. Ранее нами было показано, что в процессе РС в клетках MSCWJ-1 происходит изменение субклеточной локализации RhoA [4].

Цель работы – анализ изменений уровня GSH в МСК человека под влиянием модуляторов RhoA-ассоциированных сигнальных путей (LPA – активатор RhoA; Y-27632 – ингибитор киназы ROCK) на разных стадиях РС.

В работе использовали линию MSCWJ-1, выделенную из Вартонова студня пупочного канатика человека и полученную из ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных” ИИЦ РАН. Уровни GSH в живых клетках определяли с помощью флуоресцентного зонда FreSHtracер и системы цитометрии Image ExFluorер (LCI, Южная Корея). Клетки на 12 и 38 пассажах высевали на 24-луночные культуральные планшеты, инкубировали с FreSHtracер в течение 1,5 ч, затем измеряли соотношение флуоресценции (F510/F580) для каждой клетки ($n > 400$). Результаты анализировали с использованием GraphPad Prism версии 8.4.1 для Windows (GraphPad Software, США).

Результаты исследования демонстрируют, что РС клеток линии MSCWJ-1 сопровождается значительным снижением уровня восстановленного GSH в старых клетках по сравнению с молодыми. LPA (1 μ M) в молодых клетках вызывает снижение уровня GSH, а в старых клетках – его увеличение. Y-27632 (10 μ M) вызывает значительное увеличение уровня GSH как на раннем, так и на позднем пассаже в активной стадии РС. Исходя из полученных результатов можно предположить, что РС МСК сопровождается изменением количества рецепторов LPA.

1. Childs B. G. et al. Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy // *Nature medicine*. – 2015. – Т. 21. – №. 12. – С. 1424-1435.
2. Benjamin D. I. et al. Multiomics reveals glutathione metabolism as a driver of bimodality during stem cell aging // *Cell Metabolism*. – 2023. – Т. 35. – №. 3. – С. 472-486. e6.
3. Hobbs G. A. et al. Rho GTPases, oxidation, and cell redox control // *Small GTPases*. – 2014. – Т. 5. – №. 2. – С. e28579.
4. Bobkov D. et al. Replicative senescence in MSCWJ-1 human umbilical cord mesenchymal stem cells is marked by characteristic changes in motility, cytoskeletal organization, and RhoA localization // *Molecular Biology Reports*. – 2020. – Т. 47. – №. 5. – С. 3867-3883.

МОДЕЛЬ КОНТУЗИОННОЙ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА КАРЛИКОВЫХ СВИНЕЙ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ БМКП

Е.В. Мазукина^{1*}, О.В. Дуров², Е.В. Гулаев², В.П. Баклаушев²

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Ленинградская область, 188663

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, 117513
mazukina.ev@doclinika.ru

Позвоночноспинномозговая травма (ПСМТ) с повреждением спинного мозга (ушибом или контузией) приводит к грубому и подчас необратимому неврологическому дефициту, разрушению сегментов спинного мозга с демиелинизацией нервных волокон в зоне повреждения, нисходящей аксональной дегенерацией, утратой синапсов и сопровождается стойким ухудшением здоровья, инвалидностью и высокой летальностью [1].

Одним из потенциально эффективных методов лечения последствий травмы спинного мозга является регенеративная терапия с помощью трансплантации стволовых клеток. Пересаженные нейральные стволовые клетки (СК) способны к нейрональной и олигодендроглиальной дифференцировке. Образованные de novo нейроны, образуя синапсы реорганизуя нейронную сеть, могут создавать обходной путь для проведения нервного импульса через зону травмы, а олигодендроциты способствуют ремиелинизации поврежденных аксонов. Другой активно исследуемый вид СК — мезенхимальные стволовые клетки секретируют нейротрофические факторы, уменьшающие воспаление и стимулирующие эндогенную регенерацию тканей. Секретируемые факторы роста угнетают образование глиального рубца, обладают нейропротективным действием против эксайтотоксичности и других механизмов гибели нервных клеток [1, 2, 3].

В нашем исследовании мы разработали патогенетически корректную модель ПСМТ на крупных лабораторных животных с интраоперационной нейрофизиологической верификацией путем регистрации вызванных потенциалов. Для этого животным проводили интерламинэктомия на уровне Th9 – Th10, обнажали твердую мозговую оболочку и наносили стандартную контузионную травму спинного мозга с помощью специального импактора. Перед травмой и после травмы регистрировали моторные и соматосенсорные вызванные потенциалы с помощью игольчатых электродов и прибора для интраоперационного нейрофизиологического мониторинга Нейрософт. Оценка степени повреждения спинного мозга проводили с помощью МРТ-исследования очага в спинном мозге, кинематического анализа с видеорегистрацией и детекцией вызванных потенциалов в динамике. По окончании эксперимента проводилось гистологическое исследование спинного мозга. Показано, что полученная модель является патогенетически соответствующей ПСМТ, воспроизводимой, необратимой и приводящей к стойкому нарушению локомоции с характерными кинематическими паттернами. Данная модель апробирована для оценки эффективности регенеративной терапии. Полученные результаты включены в состав доклинического исследования нейрогенеративного препарата на основе БМКП.

Исследование проведено при финансовой поддержке ФБГУ «Федеральный центр мозга и нейротехнологий» ФМБА России.

1. Cofano F, Boido M, Monticelli M, et al. Mesenchymal Stem Cells for Spinal Cord Injury: Current Options, Limitations, and Future of Cell Therapy // Int J Mol Sci. – 20 (11). – 2019. – P. 2698.
2. Kato H, Yokota K, Fehlings MG. Regeneration of Spinal Cord Connectivity Through Stem Cell Transplantation and Biomaterial Scaffolds // Front Cell Neurosci. – 13. – 2019. – P.248.
3. Nandoe Tawarie RS, Hurtado A, Bartels RH, Grotenhuis A, Oudega M. Stem cell-based therapies for spinal cord injury // J Spinal Cord Med. – 32 (2). – 2009. – P.105-114.

УПРАВЛЕНИЕ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ ПРИ ПОМОЩИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH

А.Б. Малашичева^{1,2,3}

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

³ Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, 197341

* malashicheva@incras.ru

Остеогенная дифференцировка мезенхимных стволовых клеток — многоэтапный процесс, протекающий сходным образом при нормальном развитии костей и при таких патологиях, как кальцификация кровеносных сосудов и клапанов сердца. Внутриклеточный сигнальный путь Notch регулирует развитие и дифференцировку многих типов тканей и влияет на основные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. Notch играет важную роль в формировании костей, сопутствующем ангиогенезе, а также в патогенезе ряда заболеваний, связанных с нарушением остеогенной дифференцировки.

Мы показали, что тонко настроенное ингибирование Notch в мезенхимных стволовых клетках (МСК) нарушает остеогенную дифференцировку, тогда как активация Notch усиливает остеогенную дифференцировку. Так, ингибитор Notch кренигацестат, который был одобрен FDA для лечения некоторых видов рака, ингибировал патологическую остеогенную дифференцировку интерстициальных клеток аортального клапана у пациентов с патологической кальцификацией аортального клапана.

Ингибирование/активация Notch в МСК ингибирует или активирует остеогенную дифференцировку, соответственно. Более того, манипулирование лигандами Notch, рецепторами (Notch1-4, Dll1, Jag1) и компонентами регуляторного комплекса транскрипции (Maml1-3, CSL/RBPJ) с помощью shРНК в эндотелиальных клетках может ингибировать или активировать, соответственно, остеогенную дифференцировку в остеобластах или МСК при совместном культивировании с такими «Notch-модифицированными» эндотелиальными клетками.

Мы также показали критическую роль контакта между эндотелиальными клетками и остеобластами во время остеогенной дифференцировки с помощью протеомного и транскриптомного анализа совместной культуры остеобластов и эндотелиальных клеток и доказали критическую роль Notch в этом процессе. Мы полагаем, что возможно рассмотрение критической роли Notch и использование возможных способов контроля остеогенной дифференцировки в норме и при патологии путем модуляции компонентов Notch применительно к клиническим ситуациям, когда остеогенную дифференцировку следует подавлять (например, патологические сосудистые кальцификации) или стимулировать, когда необходим остеосинтез.

Исследование поддержано грантом РФФ 23-15-00320

НЕПОЛУЧЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЛИСИЦЫ

Е.А. Кизилова¹, Д.В. Шепелева¹, А.В. Владимирова¹, А.Г. Мензоров^{1,2},

¹ ФГБНУ ФИЦ «Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, 630090

² ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, 630090

menzorov@bionet.nsc.ru

В ИЦиГ СО РАН были выведены две популяции лисиц (*Vulpes vulpes*) с яркими различиями по поведению. Лисицы, селекционированные на одомашненность, дружелюбны, а на агрессивность – враждебны по отношению к человеку. Сравнительный анализ геномов одомашненных и агрессивных лисиц позволил найти аллели генов, вероятно принимающие участие в одомашнивании [1]. Мы планировали получить эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, генетическая модификация которых позволила бы провести функциональную проверку найденных аллелей.

В эксперименте было 10 лисиц, от 9 самок получили 42 бластоцисты. Блестящую оболочку снимали с помощью проназы. Бластоцисты от первых трех животных не освобождали от трофобласта и эмбрионы не прикреплялись к поверхности. Для следующих шести животных внутреннюю клеточную массу выделяли хирургически.

Культивирование проводили с использованием различных условий: в бессывороточной среде StemFit04 (содержит ростовой фактор FGF2) с и без добавления LIF на матриксе iMatrix-511 с фидером и без [2] и в бессывороточной среде mTeSR1 (содержит ростовой фактор FGF2) на матриксе Matrigel [3]. Была попытка использования среды культивирования на основе KSR, но эмбрионы в ней всплывали и не прикреплялись к поверхности.

Из 27 бластоцист было получено 19 линий клеток. Морфология полученных линий клеток была схожая, клетки не экспрессировали гены-маркеры плюрипотентности *Nanog*, *Oct4* и *Rex1*. Таким образом, плюрипотентность в ходе культивирования была потеряна. Для получения ЭС клеток лисицы необходимо тестировать другие условия культивирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0019.

1. Kukekova, A.V., Johnson, J.L., Xiang, X., Feng, S., Liu, S., Rando, H.M., Kharlamova, A.V., Herbeck, Y., Serdyukova, N.A., Xiong, Z., Beklemisheva, V., Koepfli, K.P., Gulevich, R.G., Vladimirova, A.V., Hekman, J.P., Perelman, P.L., Graphodatsky, A.S., O'Brien, S.J., Wang, X., Clark, A.G., Acland, G.M., Trut, L.N., Zhang, G. Red fox genome assembly identifies genomic regions associated with tame and aggressive behaviours. *Nat Ecol Evol.* 2018 Sep;2(9):1479-1491.

2. Kimura, K.; Tsukamoto, M.; Yoshida, T.; Tanaka, M.; Kuwamura, M.; Ohtaka, M.; Nishimura, K.; Nakanishi, M.; Sugiura, K.; Hatoya, S. Canine Induced Pluripotent Stem Cell Maintenance under Feeder-free and Chemically-defined Conditions. *Mol. Reprod. Dev.* 2021, 88, 395–404.

3. Gao, J.; Petraki, S.; Sun, X.; Brooks, L.A.; Lynch, T.J.; Hsieh, C.-L.; Elteriefi, R.; Lorenzana, Z.; Punj, V.; Engelhardt, J.F.; et al. Derivation of Induced Pluripotent Stem Cells from Ferret Somatic Cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2020, 318, L671–L683.

КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА И ПУПОВИННОЙ КРОВИ КАК РЕГУЛЯТОРЫ РОСТА ПЛОДОВ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В ПЕРИОД ГАСТРУЛЯЦИИ У КРЫС

В.М. Михайлов^{1*}, Е.В. Михайлова¹, А.В. Соколова¹, Д.А. Иволгин²

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

² Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург

*vmikhailov@incras.ru

Внутриутробное развитие млекопитающих сопровождается изменением иммунологического статуса клеток матери, в т.ч. и клеток костного мозга. Внимание привлекают возможности участия клеток костного мозга со стволовыми свойствами (ККМСС) матери в регуляции беременности и внутриутробного развития плодов. В данной работе представлены результаты влияния трансплантации мононуклеаров ККМСС, выделенных из костного мозга беспородных беременных крыс, на рост плодов, вскрытых на 18-й день беременности после трансплантации ККМСС самкам того же срока беременности в периоды имплантации и гастрюляции. Трансплантация ККМСС в период имплантации на 4-5 дни беременности уменьшала постимплантационную выживаемость 18 дневных плодов до 45%. При трансплантации в период гастрюляции на 7-9 дни беременности постимплантационная выживаемость плодов росла до 98%. При нормальной беременности выживаемость плодов 18 дня беременности была 95%. При трансплантации ККМСС на 11-12 дни беременности выживаемость плодов уменьшилась до 72%. Динамика изменения веса плодов была иной. Вес выживших плодов 18 дня беременности при трансплантации в период имплантации не изменился (760 мг) по сравнению с контрольными 18-ми плодами (745 мг). При трансплантации в период гастрюляции вес плодов увеличился до 835 мг. При трансплантации ККМСС диэструсных крыс беременным самкам крыс в период гастрюляции (8-9 дни беременности) средний вес 18-ти дневных плодов был 772 мг (контроль). При трансплантации ККМСС на 11-12 днях беременности вес плодов падал до 587 мг. Таким образом, если трансплантация ККМСС в период имплантации усиливала гибель плодов, не влияя на вес плодов, то трансплантация в период гастрюляция (8-9 дни беременности) увеличивала вес плодов, одновременно усиливая их выживаемость. При трансплантации на 11-12 дни беременности рост-стимулирующее действие ККМСС не обнаруживалось.

Представляет интерес, насколько распространено это явление. Из данных, полученных с клетками пуповинной крови человека (чКПК), предоставленных Покровским банком, следует, что стимуляция роста плодов крыс 18 дня беременности имеет место при подкожной трансплантации мононуклеаров чКПК в период гастрюляции. Средний вес 18-ти дневных плодов достигал 856 мг. При трансплантации чКПК на 11-13 дни беременности вес плодов возрастал только до 803 мг. Полученные данные показывают, что трансплантация ККМСС беременных крыс беременным же крысам в период имплантации уменьшает выживаемость плодов 18 дня беременности, не влияя на их вес, тогда как трансплантация ККМСС или чКПК в период гастрюляции, не оказывая патологического влияния на выживаемость плодов, стимулирует вес 18-дневных плодов. Т.о., колебания в крови беременных самок концентрации ККМСС крыс или чКПК после их трансплантации в периоды имплантации и гастрюляции оказывают как патологическое, так и рост-стимулирующее действия на последующее развитие плодов 18 дня беременности, что указывает на участие материнских клеток в регуляции развития плодов на начальных сроках беременности.

ЭКСПРЕССИЯ МАРКЕРОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ЦИСПЛАТИН-УСТОЙЧИВЫХ КЛЕТКАХ КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ПРОЦЕССА ОПУХОЛЕВОГО РЕЦИДИВА

Моршнева А.В.*¹, Гнедина О.О.¹, Козлова А.М.¹, Иготти М.В.¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064
1195alisa@gmail.com

Одной из самых острых проблем современной онкологии является рецидивирование опухолей. Раковые клетки, пережившие химиотерапевтическое воздействие, могут в течение длительного времени находиться в покоящемся, так называемом дормантном, состоянии и затем возвращаться в клеточный цикл с возобновлением роста опухоли, демонстрируя более злокачественный фенотип и устойчивость к терапии. Исследования явления дормантности тесно переплетены с исследованиями раковых стволовых клеток, так как по многочисленным литературным данным, такие клетки несут признаки стволовости [1].

Изучение механизмов дормантности и восстановления клеток после цитотоксического воздействия является актуальной задачей для поиска новых подходов к терапии рецидивирующих опухолей. Удобным объектом для таких исследований являются клеточные линии с развившейся лекарственной устойчивостью, так как они позволяют моделировать процесс опухолевого рецидива. Ранее нами была получена линия устойчивых к цисплатину клеток аденокарциномы толстого кишечника НСТ116 [2].

Целью данной работы является выявление маркеров стволовых клеток при моделировании процесса опухолевого рецидива и анализ динамики их транскрипционной активности по мере восстановления клеток после воздействия цисплатина и их возвращения в клеточный цикл для оценки возможности использования полученной модели рецидива в исследованиях, посвященных проблеме дормантности раковых клеток.

Устойчивые к цисплатину клетки линии НСТ116/С в течение 24 часов обрабатывали цисплатином в концентрации 18 μM (концентрация, которая использовалась для получения устойчивости, IC₅₀ 48ч), после чего держали клетки до полного возвращения в цикл в течение 33-42 дней. Уровень транскрипции генов интереса оценивался в устойчивых к цисплатину клетках до воздействия и через 1 - 42 дней после воздействия цисплатина. Согласно полученным результатам, после воздействия цисплатина наблюдается постепенное увеличение маркеров стволовости (*sox2*, *oct4*, *nanog*), достигающее пика к 12 дню после воздействия цисплатина. Интенсивная экспрессия маркеров стволовых клеток происходит в период с 4 по 18 день, когда клетки находятся в блоке клеточного цикла, после чего снижается с началом репопуляции.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что состояние покоя, в котором клетки находятся после воздействия цисплатина, ассоциировано с высокой экспрессией маркеров стволовых клеток. Это дает нам основание полагать, что созданная нами *in vitro* модель рецидива может быть использована для исследования явления дормантности раковых клеток и поиска новых терапевтических стратегий.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-25-20229 и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

1. Kleffel S., Schatton T. Tumor dormancy and cancer stem cells: two sides of the same coin? // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2013. (734). С. 145–179.
2. Моршнева А. В. [и др.]. Получение и характеристика линии устойчивых к цисплатину клеток рака толстой кишки человека // *Цитология*. 2022. № 4 (64).

РОЛЬ ФАКТОРОВ МЕХАНОТРАНСДУКЦИИ KLF2/KLF4 В ПОДДЕРЖАНИИ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК

А.А. Мурылёва^{1*}, Д.В. Смирнова¹, А.Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

anna.myruleva.a@gmail.com

Эндотелиальные клетки являются главными компонентами сосудистой системы, которые регулируют важные физиологические процессы, такие как ангиогенез, проницаемость сосудов и гемостаз [1]. Эндотелий способен индуцировать и регулировать остеогенную дифференцировку мезенхимальных клеток. Однако механизмы того, как эндотелиальные клетки взаимодействуют с мезенхимальными клетками и регулируют остеогенную дифференцировку, недостаточно изучены. Исследования последних десятилетий привели к пониманию того, что члены семейства транскрипционных факторов KLF (Krüppel-like factors) участвуют в регуляции биологии эндотелия. В частности, два члена этого семейства, а именно KLF2 и KLF4 напрямую регулируют ключевые эндотелиальные гены.

Цель исследования: оценить влияние даунрегуляции генов *KLF2* и *KLF4* на функциональные свойства эндотелиальных клеток с помощью лентивирусных конструкций, несущих малые шпилечные РНК.

В работе использовали культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). Подавление экспрессии генов *KLF2* и *KLF4* проводили с помощью лентивирусных частиц, несущих малые шпилечные РНК (shKLF2 и shKLF4).

Полученные данные указывают на то, что подавление генов *KLF2* и *KLF4* оказывает влияние на сигнальный путь Notch. Это проявляется в снижении экспрессии основных рецепторов, ответственных за активацию сигнального пути Notch, вместе с главной мишенью *HEY1*. Кроме того, shKLF2 и shKLF4 снижают экспрессию эндотелиальных маркеров, что может свидетельствовать об изменении функциональных свойств эндотелия. Кроме того, в условиях напряжения сдвига, после подавления гена *KLF2* наблюдается картина изменений экспрессии гена, аналогичная таковой в статических экспериментах. Данные результаты позволяют проанализировать влияние подавления генов *KLF2* и *KLF4* на свойства эндотелиальных клеток подавлять или активировать остеогенную дифференцировку мезенхимальных клеток.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

1. Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K., & Adams, R. H. (2014). Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature*, 507(7492), 323–328.

КОМПОЗИТНЫЕ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНОВ I, IV и V ТИПОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ТРАНСПЛАНЦИИ КЛЕТОК

Ю.А. Нащекина^{1,2,*}, М.Ю. Сироткина¹, А.С. Чабина¹, А.В. Нащекин², Н.А. Михайлова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194065

²Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 194021
nashchekina.yu@mail.ru

Клеточные технологии являются перспективным и быстро развивающимся направлением современной регенеративной медицины. Выделенные из тканей донора или самого пациента клетки обладают высоким регенеративным потенциалом. Однако в процессе выделения и культивирования на пластике клетки теряют свое естественное микроокружение в виде внеклеточного матрикса, что приводит к существенной потере их адгезионного и пролиферативного потенциала, а также к частичному изменению фенотипа. Создание матриц с заданной структурой, имитирующих внеклеточный матрикс нативных тканей является ключевой задачей тканевой инженерии. Коллаген – один из главных структурных элементов внеклеточного матрикса. В организме млекопитающих на данный момент обнаружено около 30 типов коллагена в различных тканях. Самым распространенным является коллаген I типа. В различных тканях он находится в виде гомополимера или в составе композитных фибриллярных структур с коллагенами других типов. Целью настоящего исследования было выделение коллагенов I, IV и V типов, формирование композитных матриц на их основе, а также изучение морфологических и пролиферативных особенностей культивируемых на таких матрицах мезенхимных стромальных клеток.

В данной работе были выделены коллагены I, IV и V типов из тканей человека и животных путем кислотной и ферментативной экстракций. Чистоту полученных белков подтверждали методами ИК-спектроскопии, иммуноблотинга и иммунофлуоресцентной микроскопии. На основе полученных белков были получены композитные матрицы с различным соотношением коллагенов разных типов. Структуру полученных матриц анализировали с помощью атомно-силовой и сканирующей электронной микроскопий.

В процессе выполнения исследований было обнаружено, что послойное нанесение коллагенов I и IV типов позволяет получить более стабильную композитную матрицу по сравнению с матрицей на основе коллагена I типа. Разработанная двухслойная матрица способствует распластыванию мезенхимных стромальных клеток и формированию межклеточных контактов. В процессе получения матриц на основе гибридных фибрилл I и V типов коллагена было обнаружено, что такие фибриллы обладают меньшим диаметром по сравнению с фибриллами на основе только I типа коллагена. Присутствие коллагена V типа в составе гибридных фибрилл способствует адгезии и пролиферации клеток на таких композитных матрицах.

Благодарность

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (Соглашение No 21-74-20120).

НАРУШЕНИЕ КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫХ НЕЙРОНАХ ПРИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *LRRK2*

А. А. Ошколова^{1, *}, Д. А. Грехнёв¹, О. С. Лебедева^{2, 3}, А. В. Крисанова¹,
Е. В. Казначеева¹, В. А. Вигонт¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика

Ю. М. Лопухина, Москва, 119435

³Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины

Федерального научно-клинического центра физико-химической медицины имени академика

Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435

* aoskolova@gmail.com

Болезнь Паркинсона (БП) является вторым по распространенности нейродегенеративным расстройством с большим разнообразием наследственных и идиопатических форм. Данное исследование сфокусировано на работе с индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК), полученными путем репрограммирования фибробластов от больных БП с мутацией *G2019S* в гене *LRRK2* и здоровых доноров. ИПСК были направленно дифференцированы в дофаминергические нейроны, массово гибнущие при БП. Полученные модели полностью охарактеризованы; подтверждена экспрессия специфичных нейрональных маркеров, в частности более 90 % полученных нейронов экспрессировали специфичный маркер дофаминергических нейронов — тирозингидроксилазу. Основное внимание было уделено изучению кальциевой сигнализации, нарушения которой неоднократно отмечались в различных моделях нейродегенеративных патологий, включая БП. Методом локальной фиксации потенциала в условиях регистрации тока от целой клетки впервые было продемонстрировано выраженное увеличение депо-управляемого входа кальция в дофаминергических нейронах, специфичных для пациентов с мутацией в гене *LRRK2*, в сравнении с нейронами, полученными от здоровых доноров. С помощью иммуноблоттинга мы показали увеличение количества белка STIM1 — активатора депо-управляемых каналов, в дофаминергических нейронах пациентов, несущих мутацию в гене *LRRK2* в сравнении с нейронами здоровых доноров. Таким образом, повышение количества STIM1 может лежать в основе патологического увеличения депо-управляемого входа кальция и массовой гибели дофаминергических нейронов пациентов с БП, ассоциированной с мутацией гена *LRRK2*, что делает депо-управляемые каналы перспективной мишенью для воздействия лекарственных препаратов.

Исследование выполнено при поддержке гранта РНФ № 22-14-00218.

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА БОЛЕЗНИ ХАНТИНГТОНА

П.С. Парфенова^{1,2,*}, Н.А. Красковская^{1,3}, А.М. Кольцова¹, А.Н. Шатрова¹, М.Г. Хотин¹,
Н.А. Михайлова¹

¹ Институт Цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, 199034

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251

* sucrederaisin@gmail.com

Моделирование нейропатологий на индуцированных нейронах, полученных с помощью технологий репрограммирования клеток, может заполнить важную нишу между клиническими испытаниями и исследованиями на модельных организмах. Важную роль в таких исследованиях играют пациент-специфичные модели на основе клеток самого пациента. В настоящей работе была получена неиммортилизованная линия дермальных фибробластов от пациента с болезнью Хантингтона (БХ), содержащая 47 повторов кодона CAG в первом экзоне гена белка хантингтин. Перед забором ткани пациентка прошла медицинский осмотр. Получено заключение этической комиссии и информированное добровольное согласие донора.

Клетки из фрагмента биоптата кожи выделяли механическим способом и культивировали в среде, содержащей 90% DMEM/F12 (Биолот, Россия) и 10% эмбриональная бычьей сыворотки (Gibco, США). Клетки пересевали с использованием раствора трипсина (0,25%) – версена (0,2%) по достижению ими 80% конфлюэнтности. Кратность посева 1:3-1:5. Клетки активно пролиферируют, жизнеспособность после криоконсервации составляет 80%. Эффективность клонирования на 6 пассаже составляет 10±1,02%. Бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминации в полученных клетках не выявлено. Методом проточной цитометрии было показано положительное окрашивание клеток на поверхностные маркеры CD44, CD73, CD90, CD105 и CD34 и отсутствие окраски на CD45 и HLA-DR, что соответствует фенотипу мезенхимных стволовых клеток. Показано, что полученные клетки имеют нормальный диплоидный набор хромосом без структурных перестроек. Из фибробластов методом прямого репрограммирования были получены индуцированные нейроны стриатума (ИНС), которые положительно окрашивались на маркеры MAP2, β-III-тубулин и DARPP-32. Кроме того в ИНС были детектированы агрегаты мутантного хантингтина.

Полученная клеточная линия может быть использована для изучения патологического фенотипа, проявляющегося как в фибробластах пациентов с данной нейропатологией, так и в индуцированных нейронах.

Исследование выполнено в рамках проекта 15.БРК.21.0011, поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1063).

СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ NOTCH КАК МЕДИАТОР ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-МЕЗЕНХИМАЛЬНОГО КЛЕТОЧНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВО ВРЕМЯ ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ.

Д.А. Переплетчикова*, А.А. Лобов, И.А. Хворова, А.Б. Малашичева

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

dasha_perepletch@mail.ru

Остеогенез и ангиогенез тесно взаимосвязаны друг с другом, а эндотелиально-мезенхимальные взаимодействия необходимы для нормальной оссификации. Однако до сих пор относительно мало известно о непосредственной роли эндотелия во время остеогенной дифференцировки и о конкретных клеточных и молекулярных механизмах, лежащих в основе.

Для выяснения роли эндотелиальных клеток в процессах остеогенной дифференцировки нами была разработана система совместного культивирования в условиях бесконтактного взаимодействия и прямого контакта двух типов клеток: первичных остеобластов человека и эндотелиальных клеток пуповины человека. В ходе исследования мы оценивали транскриптомный и протеомный профили (1) в контрольных культурах остеобластов и эндотелия без совместного культивирования, (2) в культурах остеобластов и эндотелия с бесконтактным взаимодействием и (3) в остеобластах и эндотелиальных клетках, разделенных после совместного культивирования с использованием магнитной сортировки по эндотелиальному маркеру CD31. Остеогенную среду (100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ бета-глицерофосфата) использовали для индукции остеогенной дифференцировки.

В зависимости от условий совместного культивирования мы наблюдали противоположное влияние эндотелия на остеогенную дифференцировку остеобластов: контактное культивирование усиливало, а бесконтактное подавляло остеогенную дифференцировку. Остеоиндуктивный эффект эндотелиальных клеток в совместной культуре был в основном связан с активацией компонентов сигнального пути Notch и Notch-опосредованной активацией генов остеогенной дифференцировки.

Полученные данные указывают на регулирующее влияние эндотелия в процессах остеогенной дифференцировки мезенхимных клеток и демонстрируют роль сигнального пути Notch при индукции остеогенной дифференцировки.

Исследование поддержано грантом поддержки научных школ НШ-4664.2022.1.4

ПРОЛОНГИРОВАННАЯ ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ OCT4 ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ В ЭНДОДЕРМАЛЬНОМ НАПРАВЛЕНИИ ЭСК МЫШИ, ДЕФИЦИТНЫХ ПО ГЕНАМ ИММУНОСУБЪЕДИНИЦ ПРОТЕАСОМ.

У.И. Поденкова*, Е.И. Бахмет, А.Н.Томилин, А.С. Цимоха

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

uliana.podenkova@gmail.com

Убиквитин-протеасомная система осуществляет большую часть регулируемого протеолиза и играет важную роль в регуляции плюрипотентных стволовых клеток. При этом в ранней дифференцировке мышечных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) отмечается повышенная экспрессия иммунных субъединиц протеасомы, которые при определенных условиях замещают конститутивные субъединицы, формируя иммунопротеасомы. Результаты множества исследований свидетельствуют о том, что правильное функционирование компонентов убиквитин-протеасомной системы является критически важным как для поддержания плюрипотентности, так и при подготовке клеток к дифференцировке, клеточной спецификации. Детальное понимание молекулярных механизмов, задействованных в клеточной плюрипотентности и дифференцировке, позволит расширить возможности использования таких клеток в лечении различных заболеваний, в том числе, позволит снизить вероятность появления осложнений.

В данной работе для выявления роли иммунопротеасом в ранней дифференцировке с помощью CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов мы получили линии ЭСК мыши, несущие нокаут по генам, кодирующим субъединицы иммунопротеасомы *PSMB8*, *PSMB9* и *PSMB10*. В полученных нокаутных линиях клеток подтверждена их способность поддерживать плюрипотентное состояние *in vitro* по экспрессии факторов плюрипотентности *Nanog* и *Oct4*, а также с помощью тератомного теста. В то же время, при дифференцировке мЭСК, нокаутных по генам иммуносубъединиц *LMP2* и *MECL-1*, в эндодермальном направлении мы наблюдали как экспрессию маркера эндодермальной дифференцировки *Foxa2*, так и наличие флуоресцентного сигнала при окрашивании на маркер плюрипотентности *Oct4*. Это может свидетельствовать о некоторых нарушениях в дифференцировке *in vitro* в данном направлении у нокаутных клеток, что, в свою очередь указывает на важность функционирования иммунопротеасом в ранней дифференцировке. Работа поддержана грантом РФФИ (22-14-00390).

3D ОРГАНОИДНАЯ СИСТЕМА ВЫЯВЛЯЕТ ТКАНЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ МАРКЕРЫ ПРОСТАТЫ ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТУРЕ 2D

Б.В. Попов^{1*}, В.М. Рябов¹, Н.И. Тяпкин², М.М. Барышев³, А.П. Родимцев¹,
Е.Н. Толкунова¹

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

²Ленинградский Областной Клинический Онкологический диспансер имени Романа, Кузьмолово, Россия

³Институт Микробиологии и Вирусологии, Рижский Университет им. Страдиньша, Рига, Латвия

*borisvp478@gmail.com

Рак предстательной железы (РПЖ) диагностируется в течение жизни у каждого восьмого лица мужского пола. Во многих случаях РПЖ протекает в дремлющей форме, не требующей активной терапии. В некоторых случаях болезнь трансформируется в агрессивную метастатическую форму, устойчивую к лекарственной терапии и неизбежно приводящую к быстрой смерти пациента. Маркеры перехода дремлющей формы РПЖ в агрессивную болезнь не найдены, их поиск и идентификация являются неотложной задачей, решение которой может быть основано на разработке эффективной преклинической модели РПЖ. В настоящее время активно используются две преклинические модели РПЖ: 3D органоидные культуры из опухолевой ткани простаты (PDO) и ксенотрансплантаты раковой ткани простаты иммунодефицитным мышам (PDX).

Цель настоящей работы - разработка новой преклинической модели РПЖ, в качестве которой предлагается использовать ранние пассажи первичных 2D культур раковой ткани простаты (ККП) пациентов, подвергнутых радикальной простатэктомии по поводу РПЖ. В работе использовали клетки 3-х первых пассажей первичных 2D культур опухолевой и нормальной тканей предстательной железы (ПЖ) пациентов, оперированных по поводу РПЖ. Ткань ПЖ, ранние 2D ККП использовали для получения 3D органоидных культур (ОК) в матригеле, которые возникают из тканеспецифических стволовых клеток и воспроизводят все свойства материнской ткани. Иммунофлуоресцентный анализ, иммуноблоттинг, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), полимеразная цепная реакция в реальном времени (РТ-ПЦР) были использованы для оценки экспрессии эпителиальных и опухолевых маркеров в нормальной и опухолевой ткани ПЖ, клетках ранних 2D ККП и соответствующих 3D ОК. ПЦР-продукты опухолевого маркера РПЖ TMPRSS2-ERG, полученные из опухолевой ткани, ранних 2D ККП и соответствующих 3D ОК, были клонированы и секвенированы.

Мы нашли, что клетки ранних 2D ККП и производных 3D ОК культур экспрессируют эпителиальные маркеры, а ранние 2D ККП и соответствующие 3D ОК, полученные из опухолевой ткани, продуцируют также маркер РПЖ AMACR, а в 20% из них выявляется рекомбинантный маркер РПЖ TMPRSS2-ERG. Количественная сравнительная оценка экспрессии отдельных эпителиальных и опухолевых маркеров в исходных тканях и производных 2D и 3D культурах показывает, что уровень экспрессии в 3D культурах превышает таковой или выявляет тенденцию к превышению в исходных тканях и 2D культурах.

Работа поддержана грантом РФФ № 23-25-00162.

ПАЦИЕНТ-СПЕЦИФИЧНЫЕ ИПСК С МУТАЦИЕЙ В ГЕНЕ *COH1* КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ СИНДРОМА КОЭНА

Т.А. Шнайдер¹, К.Н. Морозова^{1,2}, А.А. Хабарова¹, С. Четкина², А. Чвилева², А. Юнусова¹,
Е. Вольф¹, Е.В. Киселева¹, И.Е. Пристяжнюк^{1*}

¹ Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск

* - iprist@bionet.nsc.ru

Получения пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) представляет собой уникальную возможность моделирования заболеваний и изучение патогенеза на клетках человека. А направленная дифференцировка ИПСК в нейральные клетки – перспективное направление в изучении патологических механизмов заболеваний человека. Данные подходы уже широко применяются для изучения и моделирования нарушений развития головного мозга и нейродегенеративных заболеваний. Однако для изучения клеточных и молекулярных механизмов синдрома Коэна данный подход не был применен.

Синдром Коэна – это редкое врожденное аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с мутациями в гене *COH1* (*VPS13B*) и характеризующееся задержкой физического и умственного развития, микроцефалией, гипермобильностью суставов, гипотонией, дистрофией сетчатки и нейтропенией. Однако на данный момент оно является крайне мало изученным. В литературе встречаются лишь единичные работы, посвященные изучению этого синдрома [1,2]. Поэтому, целью нашего исследования стало выявление структурно-функциональных нарушений в культуре нейронов с мутацией *COH1*.

В данной работе нами были получены ИПСК из периферических мононуклеаров крови и фибробластов двух пациентов с синдромом Коэна. Исследование с применением методов иммуноцитохимии электронной микроскопии выявило, что мутации в гене *COH1* вызывают серьезные патологические изменения в нейральных стволовых клетках и нейронах пациентов с синдромом Коэна. Изменения внутренней организации, в том числе и уже упоминавшиеся в литературе, такие как фрагментация аппарата Гольджи и накопление аутолизосом сочетались с серьезными нарушениями структуры клеточных органоидов: митохондрий, ЭПР, ядерной мембраны. Выявленные нарушения сходны с таковыми при возрастных и детских нейродегенеративных заболеваниях, что может говорить о нейродегенеративном характере изменений при синдроме Коэна, а также об общности механизмов, лежащих в основе развития этих патологий.

Линии ИПСК доступны в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

1. Seifert W. et al. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity // *Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – V. 286. – №. 43. – P. 37665-37675. DOI: [10.1074/jbc.M111.267971](https://doi.org/10.1074/jbc.M111.267971)

2. Lee, You-Kyung, et al. Cohen Syndrome Patient iPSC-Derived Neurospheres and Forebrain-Like Glutamatergic Neurons Reveal Reduced Proliferation of Neural Progenitor Cells and Altered Expression of Synapse Genes// *Journal of Clinical Medicine*.-2020.-V. 9.- N.6. <https://doi.org/10.3390/jcm9061886>

ПОИСК НОВЫХ МУТАЦИЙ В ГЕНАХ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЕННЫХ С G-БЕЛКАМИ (GPCRs), КАК НОВАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ РАННЕЙ ДИАГНОСТИКИ ОСТЕОПОРОЗА.

И. Неганова^{1*}, Ю. Сопова^{1,2}, О. Краснова,¹ К. Кулакова¹, А.Ковалева¹, Г. Васильева², А. Жук³ и В. Карелкин⁴.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, 199034

³ Институт прикладных компьютерных наук Университета ИТМО, Санкт-Петербург, 191002

⁴ Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р. Р. Вредена, МИНЗДРАВ РФ, Санкт-Петербург, 195427

*irina.neganova@incras.ru

Остеопороз — это сложное системное метаболическое заболевание, характеризующееся патологическим изменением костной ткани, снижением прочности костей в результате преобладания процессов костной резорбции над процессом костеобразования. В России остеопорозом страдают более 14 млн человек и число заболевших продолжает расти.

В данном докладе будет рассматриваться роль мембранных рецепторов, ассоциированных с G-белком (G-protein Coupled Receptors — GPCRs), в патогенезе остеопороза и перспективы поиска мишеней среди этих рецепторов для ранней диагностики заболевания. Семейство GPCRs насчитывает более 800 членов, регулирующих около 80% всех гормонов и участвует в регуляции практически все клеточные функций. На сегодняшний день известны 92 рецептора, связанных с заболеваниями костной ткани, в том числе с остеопорозом. Для разработки эффективных методов ранней диагностики остеопороза, крайне важно выяснить клеточные и молекулярные основы, лежащие в основе заболевания.

В связи с этим, актуальной задачей нашего исследования является поиск новых генов-маркеров предрасположенности к остеопорозу, относящихся к семейству GPCRs. Проведенный биоинформатический анализ 28 SNP, ассоциированных с остеопорозом у пациентов с переломами костей, позволил определить и выбрать для дальнейших исследований три клеточные линии, с наиболее перспективными новыми сочетаниями SNP для проведения дальнейших исследований по остеодифференцировке и проверки данных SNP, как новых потенциальных маркеров остеопороза. Исследования на клеточных линиях МСК, полученных от пациентов, страдающих остеопорозом и от здоровых доноров, а также МСК, дифференцированных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСКч), полученных от пациента, несущего мутации в кальций-чувствительном рецепторе гена (*CaSR*), относящемуся к глутаматному семейству GPCRs, позволят глубже понять молекулярную природу остеопороза и выявить новые таргетные молекулы для разработки ранних методов диагностики остеопороза.

Работа выполнена при поддержке грантом Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение No. 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

КЛЕТОЧНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ОРТОПЕДО-ТРАВМАТОЛОГИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ

Савинцев А.М.^{1,2}, Багаева В.В.²

¹ ГБУЗ «Городская Покровская больница»,

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

almisav@mail.ru

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 – внутрисуставных перелома мыщелков большеберцовой кости со смещением отломков; 2 – закрытых перелома таранной кости; 2 – закрытые оскольчатые переломы диафиза длинных трубчатых костей; 11 – закрытых переломов проксимального отдела бедра; 5 – закрытых подкожных 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. 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 остеиндуцирующим 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.

МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ КАК АНТИФИБРОТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ ЛЕГОЧНОГО ФИБРОЗА: РОЛЬ УРОКИНАЗНОЙ СИСТЕМЫ

Е.В. Семина^{1*}, А.Ю. Ефименко^{1,2}, В.С. Попов^{1,2}, Н.А. Басалова^{1,2}, М.А. Виговский^{1,2}, О.А. Григорьева^{1,2}, В.Ю. Сысоева¹, П.С. Климович¹, К.А. Рубина¹.

Факультет фундаментальной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

Институт регенеративной медицины, МГУ имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

ru

Легочный фиброз характеризуется чрезмерным накоплением фиброзной ткани в паренхиме легких, нарушает дыхательную функцию и может привести к дыхательной недостаточности, результатом которой является снижение функциональных возможностей организма. К развитию легочного фиброза может привести целый ряд факторов, и долгое время этот патологический процесс оставался вне интересов исследователей, однако пандемия COVID-19 и легочный фиброз, являющийся одним из серьезных осложнений коронавируса, привел к возросшему интересу поисков молекулярных и клеточных механизмов его формирования. Известно, что урокиназная система, состоящая из активатора плазминогена урокиназного типа (урокиназы uPA) и рецептора урокиназы (uPAR), играет значительную роль в регуляции фиброзной реакции, ремоделировании внеклеточного матрикса и регенерации тканей.

Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) перспективны в регенеративной медицине и продемонстрировали потенциал в лечении легочного фиброза. Целью данного исследования было изучение потенциального антифиброзного эффекта МСК при легочном фиброзе и зависимости эффекта от экспрессии урокиназы uPA и ее рецептора uPAR.

В работе использовали модель блеомицин-индуцированного фиброза легких у мышей В1. Блеомицин вводили интраназально (доза 3 мг/кг); развитие фиброза мониторили при помощи МРТ (ClinScan 7T). Через 14 д отбирали мышей с явными признаками фиброза, и вводили МСК в яремную вену в концентрации 1×10^4 МСК/мышь (жировой ткани, мышей дикого типа WT и нокаутных по рецептору урокиназы Plaur^{-/-}). Предварительно МСК были помечены витальным флуоресцентным красителем WGA594 для детекции клеток в легких с помощью системы визуализации *in vivo* IVIS® Spectrum. Далее на разные сроки после введения клеток проводили анализ МРТ снимков, гистологическое, иммуногистохимическое окрашивание срезов легких с последующей морфометрией и статистическим анализом.

Мы обнаружили, что введение МСК любого типа достоверно уменьшает фиброз легких, однако введение Plaur^{-/-} МСК уменьшает фиброз в достоверно меньшей степени по сравнению с МСК WT. Накопление коллагена заметно ниже в легких, обработанных МСК WT, по сравнению с МСК Plaur^{-/-}. Кроме того, содержание урокиназы uPA в легких зависит от экспрессии uPAR: в группе МСК Plaur^{-/-} содержание uPA в кровеносных сосудах снижено по сравнению с группой МСК WT.

Исследование демонстрирует терапевтический антифиброгенный потенциал МСК, но в дополнение к ранее полученным результатам мы впервые показали, что эффект зависит от экспрессии uPAR в МСК. Полученные данные указывают на специфическое влияние Plaur^{-/-} МСК на накопление uPA в сосудах и позволяют предположить потенциальную модуляцию uPA-опосредованных процессов в контексте легочного фиброза. Результаты расширяют не только наше понимание роли МСК в лечении фиброза, но и позволяют рассматривать урокиназную систему как эффективную молекулярную мишень.

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, (проект № 19-75-30007).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОВОЛОКОН В КАЧЕСТВЕ СУБКЛЕТОЧНЫХ ПОДЛОЖЕК ДЛЯ КУЛЬТИВАЦИИ И ТРАНСПЛАНТАЦИИ КАРДИОМИОЦИТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ДИФФЕРЕНЦИРОВКОЙ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

М.М. Слотвицкий^{*1,2,3}, С.А. Романова¹, А.А. Аитова^{1,2}, Л.Э. Руппель¹,
В. Д. Джабраилов¹, Е.А. Турчанинова¹, К.И. Агладзе^{1,3}

¹Московский физико-технический институт, Москва, Россия

²Альметьевский государственный нефтяной институт, Альметьевск, Россия

³Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф.

Владимирского, Москва, Россия

slmxa@mail.ru

Потенциал сердечной ткани к ауторегенерации ограничен, поэтому приобретённые в течение жизни повреждения миокарда накапливаются и приводят к повышению риска возникновения аритмий. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) представляют собой потенциальный источник пациент-специфичных кардиомиоцитов, использование которых возможно для заместительной клеточной терапии и имеет существенные преимущества с точки зрения иммунной совместимости по сравнению с другими источниками человеческих кардиомиоцитов. Введение кардиомиоцитов, полученных путём направленной дифференцировки из ИПСК, возможно при помощи интрамиокардиальных инъекций, однако такой метод имеет значительные недостатки, связанные с выживаемостью клеток и образованием электрофизиологической связи между трансплантатом и тканью-реципиентом (в роли последнего выступает аутологичный монослой ИПСК-КМ).

Существующие методы манипуляций с изолированными клетками не позволяют контролировать процессы электрофизиологического кауплинга между клетками и адгезию, что приводит к стохастическому и неэффективному встраиванию клеток в сердечную ткань. В данной работе мы показали возможность влияния на эти процессы с помощью фиброиновых микроносителей - фрагментов биосовместимых полимерных волокон субклеточного размера. Фиброиновые микроносители позволяют человеческим кардиомиоцитам, полученным дифференцировкой из ИПСК (Gi-Wi протокол), сформировать необходимые фокусы адгезии на полимерной поверхности и восстановить электрофизиологическую возбудимость мембраны перед трансплантацией, что повышает эффективность кауплинга (в 2.5 ± 0.6 раз) с монослоем человеческих кардиомиоцитов (той же линии, 80 день дифференцировки).

Оптическое картирование волны возбуждения (краситель Fluo4, AM) показало, что применение микроносителей снизило долю клеток без электрофизиологического кауплинга с тканью с 19% (для суспензии клеток без микроносителей) до 3% (для клеток с фиброиновыми микроносителями) в первые 48 часов после трансплантации, что становится возможным при задействовании эпиптического механизма кауплинга клеток. Полученные результаты можно рассматривать как доказательство того, что процесс стохастического приживания инъекционных суспензионных кардиомиоцитов можно контролировать с помощью полимерных микроносителей.

ПРИМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В ЛЕЧЕНИИ ДЛИТЕЛЬНО НЕЗАЖИВАЮЩИХ ЯЗВ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ ОБЛАСТИ ГОЛЕНОСТОПНОГО СУСТАВА И СТОПЫ.

А.М. Савинцев¹, И.В. Сорокин^{1,*}, В.В. Багаева^{2,3}

СПбГБУЗ «Городская Покровская больница», Санкт-Петербург, 199106

ООО «Покровский БСК», Санкт-Петербург, 199106

СПбГБУЗ ВО им Мечникова, Санкт-Петербург, 195067

Введение. Лечение незаживающих ран при хронических ишемиях нижних конечностей является трудной и распространенной проблемой. Язвы нижних конечностей как осложнение нарушения микроциркуляции, облитерации сосудов с нарушением реологических свойств крови усугубляют проблему заживления. Течение болезни, несмотря на интенсивность лечения, может растягиваться на длительный срок или не иметь тенденции к заживлению. Приводится клинический опыт применения аутологичных и аллогенных клеточных материалов при лечении длительно незаживающих ран нижних конечностей.

Цель исследования. На клиническом примере рассмотреть возможность применения клеточных материалов для лечения длительно незаживающих ран нижних конечностей на фоне нарушения микроциркуляции и облитерации сосудов.

Материалы и методы. Клиническое наблюдение основано на лечении пациента А., 48 лет, который длительное время страдал атеросклерозом артерий нижних конечностей и длительно незаживающих ран. Пациент проходил лечение в отделении травматологии и ортопедии СПб ГБУЗ Городской Покровской Больницы, в лечении которого были использованы аутологичные и аллогенные клеточные материалы.

Результаты. Исходя из данного клинического наблюдения применения аутологичных и аллогенных клеточных материалов у пациента А., через 5,5 недель от первого введения длительно незаживающая рана нижней конечности полностью зажила с образованием состоятельного рубца.

Выводы. Применение комбинации аллогенного и аутологичного клеточного материала при лечении длительно незаживающих ран нижних конечностей, на фоне хронической ишемии и атеросклероза артерий нижних конечностей, показало высокую эффективность, что рассмотрено на примере клинического наблюдения пациента А.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЖИРОВОЙ ТКАНИ:

БЕЖЕВАЯ ЖИРОВАЯ ТКАНЬ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ И РЕМИССИИ СД2

Ю.С. Стафеев¹, М.Ю. Агарёва^{1,2}, С.С. Мичурина^{1,2}, Е.А. Шестакова³, А.О. Гаврилова³, М.С. Синеокая³, М.Ю. Меньшиков¹, М.В. Шестакова³, Е.В. Парфёнова^{1,2}

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" МЗ РФ, Москва, 121552

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии" МЗ РФ, Москва, 117292

yuristafeev@gmail.com

В настоящее время ожирение и важнейшее его метаболическое осложнение в лице сахарного диабета 2 типа (СД2) являются важнейшими патологиями в структуре заболеваемости. Основными причинами развития ожирения и его осложнений являются положительный баланс между потреблением и расходом энергии. Первой тканью, сталкивающейся с последствиями этого дисбаланса, является жировая ткань, вынужденная запасать избыток энергетических субстратов в адипоцитах. Важнейшим компонентом жировой ткани являются мезенхимные стволовые клетки (МСК ЖТ), которые обладают иммуномодулирующими, противовоспалительными и прогениторными свойствами. Вопрос о том как динамика состояния и дифференцировочного потенциала МСК ЖТ влияет на развитие СД2 и его «обращение» при ремиссии является чрезвычайно актуальным для современной биомедицины.

В экспериментах использовали МСК ЖТ, полученные из подкожной ЖТ пациентов с СД2Т. МСК ЖТ выделяли у пациентов до терапевтического воздействия, а также спустя полгода после коррекции ожирения путем бариатрической операции или терапии аналогом ГПП-1 семаглутидом (пациенты с ИМТ > 35 кг/м², длительность ожирения более 10 лет). Дифференцировку адипоцитов в бежевом направлении осуществляли в течение 21 дня по стандартному протоколу с использованием трийодтиронина и изопротеренола. Эффективность бежевого адипогенеза оценивали по экспрессии разобщающего белка UCP-1. Также в клетках до и после терапии оценивали термогенез с помощью термочувствительного красителя ERthermAC и изотопного анализа.

В работе было показано, что развитие СД2Т сопровождается снижением экспрессии белка UCP1 в составе бежевых адипоцитов. Более того, падение экспрессии UCP1 способствовало задержке электронов в ЭТЦ и усиленному формированию АФК в составе митохондрий. Таким образом, формирование СД2Т тесно ассоциировано с нарушением функции бежевых адипоцитов. Терапия аналогом ГПП-1 продемонстрировала существенное снижение массы тела пациентов, что было связано с активацией бежевого адипогенеза. В частности, данные бежевые адипоциты после антидиабетической терапии обладали усиленным термогенезом, а также усиленным поглощением глюкозы и увеличенной скоростью разобщенного дыхания. Снижения веса и улучшение показателей при сахароснижающей терапии тесно ассоциировано с улучшением функции бежевых адипоцитов.

Резюмируя, бежевая жировая ткань является важным звеном в переходе от ожирения к СД2. В то же самое время, действие сахароснижающей инкретиновой терапии при СД2 связано с активацией бежевой дифференцировки МСК ЖТ, усилением функции бежевых адипоцитов и снижением веса пациентов

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда 22-15-00365.

СТРАТЕГИЯ ВНЕДРЕНИЯ В КЛИНИЧЕСКУЮ ПРАКТИКУ ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

О.В. Супильникова^{1,3*}, В.В. Багаева^{1,3}, Т.Л. Золина¹, А.В. Котова^{1,3}, А.И. Конкина¹, Н.И. Енукашвили^{1,3}, Е.М. Приходько¹, Ю.В. Юркевич¹, Е.В. Зиновьев²,

¹ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, Россия

² НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

* supilnikova@pokrovcell.ru

Разработка и внедрение клеточных продуктов для лечения тяжелых заболеваний и травматических поражений кожи остаются одними из приоритетных направлений развития современной медицины и медицинской биотехнологии во всем мире. Главная цель лечения – завершить полное восстановление кожного покрова в кратчайшие сроки. Для реализации данной цели есть стандартные методики лечения, но малоэффективные, которые не включают в себя применение БМКП. Более ранние исследования показали, что внесение в рану БМКП на основе аллогенных фибробластов улучшает рост клеток эпителия, эндотелия и собственных фибробластов, улучшает пролиферацию тканей и хемотаксис клеток; уменьшает вероятность поражения инфекцией, рост рубцовых тканей, сокращает время заживления, период нетрудоспособности; восстанавливает нормальное функционирование тканей после повреждения. Однако для успешного внедрения в клиническую практику необходимо учитывать соотношение ожидаемой пользы и необходимых затрат при применении БМКП.

Таким образом, была поставлена задача по расчету актуальности внедрения БМКП в действующие тарифы ОМС и ВТМП. Расчет был произведен на основе данных профильного государственного стационара НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе г. Санкт-Петербург, который входит в список медицинских организаций имеющих аккредитацию на право проведения клинических исследований биомедицинских клеточных продуктов и опытного производства БМКП на базе ООО «Покровский банк стволовых клеток». Количество ожоговых больных в этом стационаре составляет в среднем 1200 в год, из них тяжелобольных около 400 пациентов. Основным преимуществом БМКП на основе фибробластов является ускорение сроков эпителизации, а, следовательно, сокращение койко-дней пребывания больного в стационаре. По данным из генерального тарифного соглашения стоимость тарифа на лечение ожогов сравнили со стоимостью разрабатываемого БМКП.

Проведенный анализ показал, что стоимость затрат на лечение с применением БМКП не только не выходит за рамки тарифа, но и уменьшает стоимость лечения. А также значительно сокращается количество койко-дней пребывания больного в стационаре.

НИИ скорой помощи им. Джанелидзе оказывает помощь не только в рамках тарифов ОМС, но и по соответствующим квотам ВТМП. Применение БМКП в комбинации с аутопластикой позволит также сократить сроки пребывания больных в стационаре, а также избежать последующих осложнений в виде грубых рубцов и контрактур, что сократит расходы на необходимость последующих операций.

Однако стоит отметить, что пока сложно рассчитать изменение стоимости продукта при переносе технологии из лаборатории в производство, а также зависимость от масштабирования и меняющейся геополитической обстановки.

Таким образом, разработанная нами стратегия и произведенный расчёт применения с учетом тарифов ОМС и ВТМП подтверждают целесообразность внедрения клеточных продуктов в клиническую практику.

ПОЛУЧЕНИЕ ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ БИОКОМПОЗИТНЫХ ГЕЛЕЙ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И ФИБРОИНА ШЕЛКА

А.Р. Титова^{1,2*}, М.А. Финк^{1,2}, С.А. Александрова¹, Д.М. Дарвиш^{1,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

³ Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, 191186

titova_56@mail.ru

Костные дефекты больших размеров, возникающие в результате переломов, заболеваний и генетических нарушений, не могут полностью восстановиться и требуют дополнительной стимуляции с применением остеопластических материалов. В настоящее время активно разрабатываются новые биоматериалы такого назначения. Коллаген I типа представляет особый интерес для создания остеоиндуктивных биоматериалов, так как в костной ткани его содержание составляет 30% межклеточного матрикса. Однако, при создании биоматериалов на основе коллагена их существенным недостатком являются низкие механические свойства и высокая скорость биodeградации, не соответствующая скорости репарации костной ткани. Добавление фиброина шелка в коллаген может позволить компенсировать эти недостатки.

Целью данной работы является разработка биокomпозитных гелей на основе коллагена I типа и фиброина шелка и оценка их механических характеристик.

Раствор коллагена I типа получали из сухожилий крысиных хвостов методом кислой экстракции. Такой метод позволяет полностью сохранить молекулярную структуру коллагена, благодаря чему он способен самособираться в нативные фибриллы в условиях *in vitro*. Раствор фиброина шелка был получен из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Коконы вываривали в кипящем 0.02 М растворе Na₂CO₃ для избавления от серицина, а затем растворяли в 9,3 М LiBr при 60°C в течение 4 ч.

Для формирования композитных гелей предварительно инициировали процесс фибриллообразования в коллагене и процесс кристаллизации в фиброине. В растворе коллагена этот процесс инициировали путем смешивания с нейтрализующим солевым раствором (NaCl, Na₂HPO₄, HEPES буфер и NaOH), а в растворе фиброина шелка - путем озвучивания на ультразвуковой установке в течение 20-40 сек. Сразу после этого коллаген и фиброин смешивали в соотношении 19:1, 9:1, 4:1, заливали в цилиндрические формы и термостатировали при 30°C в течение 24 ч. В результате было сформировано три варианта биокomпозитов в виде плотных гелей с трехмерной структурой.

Полученные таким образом биокomпозитные гели испытывали в режиме пластического сжатия на универсальной установке для механических испытаний Instron 1122 (Великобритания). Устойчивость к сжимающим деформациям всех матриц, содержащих фиброин, возростала в 4.5-5.2 раза по сравнению с гелями, состоящими только из коллагена. Так, сжимающее напряжение в коллагеновом геле составило 40 кПа, а в биокomпозитных гелях с соотношением компонентов 19:1 – 180-195 кПа; 9:1 – 182-208 кПа; 4:1 – 200-210 кПа.

Введение в состав коллагеновых гелей фиброина шелка позволило существенно повысить механические характеристики. Так как на основании литературных данных известно, что фиброин проявляет остеоиндуктивные свойства, то полученные материалы обладают высоким потенциалом для их применения при восстановлении костной ткани. В дальнейшем планируется исследование биосовместимости и остеоиндуктивности всех полученных биокomпозитов с использованием клеточных линий.

Исследование проводилось при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008.

ПРИМЕНЕНИЕ ЛИЗАТА ТРОМБОЦИТОВ СО СНИЖЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ ФИБРИНОГЕНА ДЛЯ ЭКСПАНСИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ ВАРТОНОВА СТУДНЯ ПУПОЧНОГО КАНАТИКА ЧЕЛОВЕКА

Л.Н. Токтохоева^{1,3}, Е.С. Дёмина^{1,3}, Н.П. Рабданова¹, Р.Ю.Абашеев¹, А.С. Долодоев^{1,2},
А.П. Цыбденова^{1,2,3*}, Ю.С. Балханов^{2,3}, А.А. Нимаева³, М.В.Игнатъева³, М.Ф. Серых³, Е.Ж.
Мункоева⁴, Г.П. Носкова⁴, М.Н. Бутуханова⁴

¹Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова
Россия, Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, 670000

²ООО «МИП «Байкальский центр биотехнологий», Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, 670034

³ООО «Шэнэскин», Республика Бурятия, г. Улан-Удэ, 670034

⁴Бурятская республиканская станция переливания крови МЗ РБ, Республика Бурятия, г.
Улан-Удэ, 670047

* tsybdenova.aryuna@mail.ru

В настоящем исследовании проведена оценка эффективности использования лизата тромбоцитов в качестве альтернативы эмбриональной телячьей сыворотки для экспансии мезенхимальных стволовых клеток из стромы пупочного канатика человека в клинических и лабораторных протоколах. Целью работы являлось определение морфофизиологических особенностей и пролиферативной активности мезенхимальных стромальных клеток из вартонова студня пупочного канатика человека, культивируемых в среде с содержанием лизата тромбоцитов с редуцированным объемом фибриногена.

Выделение мезенхимальных стромальных клеток осуществляли из вартонова студня пупочного канатика человека ферментативным способом с помощью коллагеназы I типа и эксплантами в среде DMEM/F12 с 5% лизата тромбоцитов. Лизат тромбоцитов получали из лейкоредуцированного пулированного концентрата тромбоцитов. После криодеструкции (-20 °С) образцы с тромбоцитами центрифугировали (3000 об./минуту, 15 минут), фильтровали и добавляли в бессывороточную среду с антибиотиками. Анализ экспансии, выхода из разморозки после криоконсервации и длительность пассажей мезенхимальных стромальных клеток пупочного канатика проводили в среде с 5% лизата тромбоцитов в сравнении с клетками, культивированными в среде с 10% фетальной телячьей сывороткой.

Установлено, что выделенные культуры клеток экспрессируют следующие поверхностные маркеры: CD73, CD90, CD105, CD44, CD29 и характеризуются отсутствием на поверхности: CD34, CD45, HLA-DR, CD11b, CD19. Показано, что при внесении 5% лизата тромбоцитов в питательную среду, клетки сохраняли пролиферативную активность после заморозки/разморозки (-196°С) и были идентичны с культурами, которые вели в среде с фетальной телячьей сывороткой. Показано, что внесение тромболизата со сниженной концентрацией фибриногена в специализированную питательную среду обеспечивает получение качественного клеточного трансплантата в те же сроки, что и при культивировании с эмбриональной телячьей сывороткой. Полученные данные позволяют рекомендовать использование лизата тромбоцитов в качестве альтернативы ксеногенной сыворотки в протоколах *in vitro*.

ОСОБЕННОСТИ МИНЕРАЛИЗАЦИИ БИОКОМПЗИТНЫХ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ КОЛЛАГЕНА И БИОСТЕКЛА В МОДЕЛЬНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ СРЕДАХ

М.А. Финк^{1,2*}, А.Р. Титова^{1,2}, С.А. Александрова¹, Д.М. Дарвиш^{1,3}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

³ Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Санкт-Петербург, 191186

*e-mail: maksim.fink.spbu@gmail.com

Одним из ключевых параметров оценки эффективности остеопластического материала является способность к минерализации в модельных физиологических условиях. Биостекло выделяется среди материалов, способных интегрироваться с нативной костью за счет формирования на его поверхности слоя гидроксиапатита. Введение биостекла в состав остеоиндуктивных биоконпозитов может ускорять процессы минерализации таких материалов. Основная задача данной работы - создание биоконпозитов на основе коллагена и биостекла и последующая оценка степени их минерализации в модельных биологических средах.

Формирование биоконпозитов состояло из следующих этапов: получение коллагеновых гелей с добавлением биостекла, компрессия гелей, создание объемных структур и их стабилизация сшивающими агентами. Для получения гелей в раствор коллагена I типа вводили гранулы биостекла («Биосит-СР Элкор», Санкт-Петербург). Затем коллаген, содержащий биостекло, смешивали с нейтрализующим соевым раствором (NaCl, Na₂HPO₄, HEPES-буфер, NaOH) и термостатировали в течение 24 ч при 30°C. Содержание биостекла в гелях составляло 1.5%, 3% и 6%. Полученные композитные гели подвергали компрессии для удаления избыточной влаги, после чего из них формировали свернутые структуры в виде небольших рулонов. Чтобы обеспечить стабильность такой структуры применяли химическое сшивание с использованием EDC и NHS (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США).

Для оценки степени минерализации биоконпозитов было выбрано четыре варианта модельных биологических сред, варьировавшихся по содержанию CaCl₂, MgCl₂, NaHCO₃, Na₂CO₃ и NaCl, а также по наличию буферных систем HEPES или Tris (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, США). Полученные образцы инкубировали в этих средах в течение месяца при температуре 37°C, что способствовало формированию минеральных структур на их поверхности. Интенсивность и характер минерализации оценивались как визуально, так и методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Можно было отметить, что минерализация наблюдалась во всех изученных образцах, но с разной интенсивностью. Наиболее выражено этот процесс происходил в растворах с высоким содержанием CaCl₂ и MgCl₂ в присутствии HEPES буфера. Анализ минерализованных биоконпозитов с использованием СЭМ позволил выявить глобулярные минеральные структуры, типичные для гидроксиапатита, на поверхности всех образцов.

Исследование проводилось при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008.

ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ КАК СРЕДСТВО ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ И РАЗРАБОТКИ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ПРОЦЕССОВ ВОЗНИКНОВЕНИЯ АРИТМИЙ

В.А. Цвеляя^{1,2,3*}, М.М. Слотвицкий^{1,2,3}, А.А. Аитова^{1,2,3}, С.А. Романова^{1,2,3}, К.И. Агладзе^{1,3}

¹Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), факультет биологической и медицинской физики, Российская Федерация

²Альметьевский государственный нефтяной институт

³Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области "Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского

[*vts93@yandex.ru](mailto:vts93@yandex.ru)

На данный момент существует множество споров о зависимости сердечно-сосудистых заболеваний от фенотипа сердечных клеток, получаемых в стадии формирования сердца и при его развитии всю жизнь пациента. Есть примеры сердечных аритмий, приобретенных от приема лекарственных препаратов, от стресс-факторов, вследствие других заболеваний [1,2,3]. В данном случае внешние факторы могут повлиять на сердечную ткань и необратимо, меняя их фенотип и функциональность. Одной из задач современной медицины, таким образом, можно считать сопоставление факторов, приводящих к патологическому фенотипу в зависимости от генотипа и вне зависимости от него. Для решения этой задачи мы изучили электрофизиологическую зрелость клеток как зависящий параметр от этапа направленной клеточной дифференцировки. Несмотря на большое количество работ, посвященных зрелости клеток, основанных на сравнении экспрессии характерных белков/факторов зрелого кардиомиоцита и кардимиоцита из ipsc, функциональность кардиомиоцита и его ионных каналов после дифференцировки при разнообразии методов изучена мало. На основе собранных нами данных о периодах развития клеток в процессе их дифференцировки в кардиомиоциты был разработан новый тест, направленный на исследование пациент-специфичных патологий и аритмогенность препаратов. Данный тест может гарантировать соответствие электрофизиологии клеток из ipsc и реальных человеческих км, так как основан на регистрации потенциала действия и кальциевой динамики, что позволяет сравнивать результаты теста с реальными клиническими данными.

На основе разработанной модели можно качественно и численно изучать влияние таких факторов как увеличение ЧСС и изменения в работе каналов, определить меру и характер влияния данных факторов на изменение аритмогенности. В данной работе представлено исследование механизма образования аритмий, определение индивидуальных временных рамок для исследования в соответствие с созреванием кардиомиоцитов после дифференцировки, что кардинально отличается от генотипических исследований. Представлено количественное определение аритмогенности культуры, а также различия в процессах образования аритмий на смоделированных патологиях.

Самыми главными результатами представляемого исследования можно считать:

- 1) Выявление этапов и корреляций с эмбриогенезом сердца в развитии, созревании и функциональности кардиомиоцитов пациента, полученных *in vitro* в процессе дифференцировки [4].
- 2) Создание тестирования, выявляющего риск возникновения аритмий как под воздействием как внешних факторов, так и врожденных пациент-специфичных патологий [5,6]

1. Jabri, A., Kalra, A., Kumar, A., Alameh, A., Adroja, S., Bashir, H., ... & Hedrick, D. P. (2020). Incidence of stress cardiomyopathy during the coronavirus disease 2019 pandemic. *JAMA network open*, 3(7), e2014780-e2014780.

2. Gerdes A. M., Iervasi G. Thyroid replacement therapy and heart failure //Circulation. – 2010. – Т. 122. – №. 4. – С. 385-393.

3. Sattar Y. et al. COVID-19 presenting as takotsubo cardiomyopathy complicated with atrial fibrillation //International Journal of Cardiology. Heart & Vasculature. – 2020. – Т. 29. – С. 100580.

4. Slotvitsky M. M. et al. Formation of an electrical coupling between differentiating cardiomyocytes //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-11.

5. Slotvitsky M. et al. Arrhythmogenicity test based on a human-induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived cardiomyocyte layer //Toxicological Sciences. – 2019. – Т. 168. – №. 1. – С. 70-77.

6. Podgurskaya A. D. et al. Cyclophosphamide arrhythmogenicity testing using human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes //Scientific reports. – 2021. – Т. 11. – №. 1. – С. 1-13.

ВЛИЯНИЕ СТРУКТУРИРОВАННОЙ ПОВЕРХНОСТИ МАТРИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-ε-КАПРОЛАКТОНА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК

А.С. Чабина^{1,*}, П.С. Середкина¹, А.В. Лихачев², А.В. Нащекин², Н.Д. Просалов², Ю.А. Нащекина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194065

²Физико-технический институт имени А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 194021

chabina-alina@yandex.ru

Вариабельные механические характеристики поли-ε-капролактона (ПКЛ) и простота манипуляций с полимером позволили адаптировать материал для широкого спектра задач регенеративной медицины. К тому же введение дополнительных функциональных групп в молекулу полимера в процессе модификации позволяет повысить биосовместимость ПКЛ и минимизировать негативный эффект таких его свойств, как гидрофобность, отсутствие функциональных групп и в целом синтетическую природу материала [1].

Еще одной особенностью ПКЛ является его полукристаллическая структура, которая при физиологической температуре обеспечивает ему высокую прочность и эластичность. Помимо этого, она придает особую топологию матрицам на основе ПКЛ за счет формирования сферолитов – анизотропных структур различного диаметра [2].

Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния структурированной поверхности ПКЛ на эффективность модификации полимера, а следовательно, на адгезию и пролиферацию клеток, что ранее не учитывалось при проведении модификаций ПКЛ.

Матрицы со структурированной поверхностью получали методом полива при варьировании концентрации раствора полимера, объема раствора нанесения и температуры при испарении растворителя. ПКЛ модифицировали, инкубируя матрицы в 0,5М водном и 0,25М водно-спиртовом растворами аргинина при T=40°C (1 час) и T=25°C (24 часа).

Изменение поверхностной топологии оценивали с помощью СЭМ, АСМ и оптической микроскопии. Было выявлено, что варьирование температуры при испарении растворителя оказывает наибольший эффект на размер сферолитов. Нингидриновым методом было показано, что структура поверхности ПКЛ матриц влияет на сорбцию аргинина при проведении модификации. Наибольший вклад также вносит варьирование температуры при испарении растворителя. Методом сидячей капли было доказано увеличение гидрофильности матриц после их модификации.

Оценка адгезии мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с помощью генцианвиолета показала, что структурирование поверхности не увеличивает количество адгезировавших клеток в сравнении с контролем. Это было подтверждено флуоресцентной микроскопией по подсчету ядер. Миграция МСК на немодифицированных ПКЛ матрицах показала, что наибольшей скоростью обладают МСК, посеянные на матрицы, полученные при варьировании температуры при испарении растворителя.

Влияние модификаций на МСК оценивали с помощью конфокальной микроскопии. Было выявлено, что любая модификация оказывает положительное влияние на культивирование клеток, однако наибольшее влияние оказывает модификация ПКЛ матриц 0,5М водным раствором аргинина. Это подтверждается подсчетом количества клеток после культивирования в течении 2, 4 и 24 часов.

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ (Соглашение No 21-74-20120).

1. Nashchekina Y. et al. // Int. J. Mol. Sci. J. 2020. V. 21. P. 6989;
2. Nadeem, S. et al. // Mol Biotechnol. J. 2018. V. 60. P. 506 – 532.

ВЛИЯНИЕ ДЕЛЕЦИЙ HAR, ЛОКАЛИЗОВАННЫХ В ГЕНЕ *CNTN6*, НА РАННИЕ ЭТАПЫ НЕЙРОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

А.С. Чвилёва^{1*}, А.М. Юнусова², И.Е. Пристяжнюк², А.С. Рыжкова², А.В. Смирнов²,
П.С. Белокопытова^{1,2}, Т.А. Шнайдер²

¹Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090

* a.chvileva@g.nsu.ru

В ходе эволюции головной мозг человека увеличился в размерах примерно в три раза по сравнению с ныне живущими гоминидами. Усложнение строения мозга привело к значительному удлинению этапов его развития, любые отклонения в которых могут приводить к нервно-психическим расстройствам. Причины подобных патологий часто кроются в наследственных факторах. Исторически поиск подобных мутаций был сосредоточен в белок-кодирующей части нашего генома, что затрудняло выявление всех возможных вариантов нарушений ДНК. С развитием геномных методов анализа фокус внимания сместился к некодирующим регуляторным областям генома. Одними из ключевых регуляторных элементов, отвечающих за развитие головного мозга человека, считаются недавно открытые human accelerated regions (HAR) [1]. Это высоко консервативные некодирующие последовательности ДНК у млекопитающих, начавшие в ходе эволюции человека накапливать специфические мутации, закрепившиеся в популяции. Благодаря исследованиям последних лет было установлено, что многие HAR являются энхансерами генов развития мозга человека, а мутации в них приводят к развитию различных психических расстройств [2].

Объектом нашего внимания является ген-кандидат нарушений умственного развития – *CNTN6*. Большинство ассоциированных мутаций в данном гене представлены CNV крупных размеров, однако точечная замена была обнаружена лишь в одном клиническом случае. В связи с этим нами было выдвинуто предположение о наличии регуляторных участков в *CNTN6*, удаление которых может привести к нарушениям ранних этапов развития мозга человека. Аннотированных регуляторных элементов в данном локусе не было обнаружено, однако были выявлены HAR, которые пересекаются с делециями у многих пациентов. Целью данной работы является исследование эффекта делеций HAR, расположенных в локусе *CNTN6*, на ранние этапы нейрогенеза человека с помощью церебральных органоидов (ЦО).

Для выполнения данной цели были получены линии ИПСК с гомозиготными делециями районов, содержащих HAR. Полученные линии дифференцированы в ЦО [3], для которых был проведен морфологический анализ особенностей ранних этапов нейрогенеза. При дифференцировке была выявлена тенденция к уменьшению размеров органоидов с делецией HAR по сравнению с контролем. Исследование внутренней организации ЦО позволило выявить, что на 20-й день дифференцировки в органоидах с делецией HAR достоверно уменьшается площадь нейроэпителия относительно контрольных образцов, а также толщина и площадь нейроэпителиальных структур. Таким образом, делеция HAR в гене *CNTN6* приводят к нарушениям формирования нейроэпителиальных структур ЦО.

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (№ 075-15-2021-1063).

1. Pollard K. S. et al. An RNA gene expressed during cortical development evolved rapidly in humans //Nature. 2006. T. 443. No. 7108. C. 167-172.
2. Doan R. N. et al. Mutations in human accelerated regions disrupt cognition and social behavior //Cell. 2016. T. 167. No. 2. C. 341-354. e12.
3. Lancaster M. A. et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly //Nature. 2013. T. 501. No. 7467. C. 373-379.

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА ФОРМИРОВАНИЯ НЕЙРОЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТРУКТУР НА МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ИНГИБИРОВАНИИ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH

С.А. Чечеткина^{1*}, Т.А. Шнайдер²

¹ Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, 630090

² Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, 630090

* s.chechetkina@g.nsu.ru

Развитие головного мозга остается одним из самых сложных механизмов, происходящих в человеческом организме. Данный процесс начинается в эмбриональном периоде и контролируется несколькими сигнальными путями. Одним из ключевых является сигнальный путь Notch, который участвует в развитии многих тканей, в том числе нервной. Данный путь является высоко консервативным и определяющим для развития и специализации нейронов, а также дифференцировки, самообновления и поддержания популяции клеток радиальной глии [1]. Однако роль этого сигнального каскада в более ранних стадиях нейрогенеза остается мало изученной, особенно у человека. В связи с этим, основной целью данной работы является исследование эффекта ингибирования сигнального пути Notch на формирование нейроэпителиальных структур в раннем нейрогенезе человека.

Благодаря разработке технологии получения церебральных органоидов [2] стало возможным реконструирование ранних этапов нейрогенеза человека. Основой для их получения являются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Для исследования роли сигнального пути Notch была выбрана стратегия его ингибирования при помощи ингибитора гамма-секретазы DAPT в ходе дифференцировки церебральных органоидов. Иммуноцитохимический анализ и конфокальная микроскопия были применены для изучения внутренней организации органоидов.

В результате, мы обнаружили, что органоиды, обработанные DAPT, обладали меньшими размерами. В них также уменьшалось количество и размеры нейроэпителиальных структур, в том числе размер апикальной мембраны. В контрольных органоидах PAX6+ клетки были преимущественно организованы в нейроэпителиальные структуры, в то время как в обработанных DAPT органоидах PAX6+ клетки были не структурированы, кроме того, их количество было значительно меньше.

Таким образом, при ингибировании сигнального пути Notch происходит нарушение формирования клеток радиальной глии на ранних этапах нейрогенеза, что приводит к дезорганизации внутренней структуры церебральных органоидов.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (проект № 075-15-2021-1063). Культивирование линий ИПСК проводили на базе ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общепромышленного и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН. Микроскопический анализ проведен на базе ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН.

1. Lui JH, Hansen DV, Kriegstein AR. Development and evolution of the human neocortex. Cell. 2011 Jul 8;146(1):18-36. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.030. Erratum in: Cell. 2011 Jul 22;146(2):332. PMID: 21729779; PMCID: PMC3610574.

2. Lancaster MA, Knoblich JA. Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. Nat Protoc. 2014 Oct;9(10):2329-40. doi: 10.1038/nprot.2014.158.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ГЕНА *CNTN6* В РАННИХ ЭТАПАХ НЕЙРОГЕНЕЗА ЧЕЛОВЕКА НА МОДЕЛИ ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ОРГАНОИДОВ

Т.А. Шнайдер^{1*}, А.М. Юнусова¹, С.А. Четкина², А.С. Чвилева², П.С. Белокопытова^{1,2}, А.А. Хабарова¹, А.С. Рыжкова¹, И.Е. Пристяжнюк¹, А.В. Смирнов¹, О.Л. Серов^{1,2,3}

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, 630090

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск, 630090

³ Томский НИИ медицинской генетики, г. Томск, 634050

*shnayder.t@yandex.ru

Развитие головного мозга человека представляет собой сложный и многоэтапный процесс, поэтому любые нарушения в нем могут привести к возникновению нейропсихиатрических патологий. В настоящий момент частота встречаемости данных заболеваний составляет около 3%. Генетическими причинами таких нарушений могут быть как точечные мутации, так и крупные хромосомные перестройки. Объектом нашего внимания является ген *CNTN6*, поскольку за последние годы было зарегистрировано более 200 пациентов с различными нарушениями развития головного мозга, вызванными мутациями в данном гене [1,2]. Интересно, что в подавляющем большинстве случаев у таких пациентов обнаруживаются крупные делеции или дупликации, затрагивающие практически весь ген *CNTN6*. К сожалению, исследования на модельных организмах, ввиду колоссальных видоспецифических различий, не позволили продвинуться в понимании клеточных и молекулярных механизмов данной патологии. В связи с этим, роль гена *CNTN6* в нейрогенезе человека остается не выясненной.

Используя современные подходы в моделировании патологий развития головного мозга, в частности репрограммирование генома [3] и технологию церебральных органоидов [4], нам удалось установить, что белок CNTN6 вовлечен в процесс формирования нейроэпителлия и регуляцию пролиферации клеток радиальной глии. Кроме того, мы впервые обнаружили, что CNTN6 участвует в ядерно-цитоплазматической транслокации белка PAX6, одного из ключевых регуляторов развития кортекса. Детальное изучение молекулярных механизмов позволило нам установить, что в ходе ранних этапов нейрогенеза человека CNTN6 действует преимущественно через сигнальный путь Notch. Важно отметить, что публикации последних лет указывают на крайне важную роль данного сигнального каскада в эволюции головного мозга человека, в частности в увеличении его размеров. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о совершенно новой ранее не описанной функции гена *CNTN6* в ранних этапах нейрогенеза человека.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 19-29-04067), бюджетного проекта (№ FWNR-2022-0019) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 075-15-2021-1063).

1. A. A. Kashevarova *et al.*, ‘Single gene microdeletions and microduplication of 3p26.3 in three unrelated families: CNTN6 as a new candidate gene for intellectual disability’, *Mol. Cytogenet.*, vol. 7, no. 1, p. 97, 2014, doi: 10.1186/s13039-014-0097-0.
2. J. Hu *et al.*, ‘CNTN6 copy number variations in 14 patients: a possible candidate gene for neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders’, *J. Neurodev. Disord.*, vol. 7, no. 1, p. 26, Aug. 2015, doi: 10.1186/s11689-015-9122-9.
3. K. Takahashi *et al.*, ‘Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors’, *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, Nov. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
4. M. A. Lancaster *et al.*, ‘Cerebral organoids model human brain development and microcephaly’, *Nature*, vol. 501, no. 7467, pp. 373–379, Sep. 2013, doi: 10.1038/nature12517.

БЕСКЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ В КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Н.М. Юдинцева^{1*}, Д.Е. Бобков¹, М.И. Сулацкий¹, Т.И. Виноградова², А.Н. Муравьев²,
А.Н. Ремезова², Р.Х. Зиганшин³, С.И. Ковальчук³, А.А. Тен⁴, М.А. Шевцов^{1,4},
Н.А. Михайлова¹

¹ Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

² НИИ Фтизиопульмонологии МЗ РФ, г. Санкт-Петербург, 191036

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, г. Москва, 117997

⁴ Институт наук о жизни и биомедицины, ДВФУ, г. Владивосток, 690922

* yudintceva@mail.ru

Одним из тяжелых последствий туберкулеза (ТБ) является патоморфологическое изменение тканей различных органов. Разработка новых подходов для лечения бактериальных инфекций является одной из актуальных задач трансляционной медицины. В последние годы наблюдается значительный интерес к применению внеклеточных везикул (ВВ) для лечения ряда заболеваний, поскольку белки и РНК, входящие в их состав, играют важную роль в паракринной регуляции и регенерации тканей. По сравнению с клеточной терапией, ВВ обладают рядом преимуществ: низкой иммуногенностью, стандартизацией процессов выделения и хранения, отсутствием риска возникновения трансформаций, стабильной мембранной структурой, возможностью использования аллогенного продукта, что и делает ВВ перспективным инструментом в комплексной терапии различных заболеваний.

В данной работе мы исследовали терапевтическую эффективность ВВ, выделенных из мезенхимных стволовых клеток (МСК-ВВ) костного мозга кролика, в комплексном лечении ТБ почек. При создании модели ТБ почек штамм *Mycobacterium tuberculosis H37Rv* вводили в кортикальный слой паренхимы почки кролика. Эффективность развития ТБ оценивали через 18 суток после заражения, затем на протяжении эксперимента проводили стандартную противотуберкулезную терапию (ПТБТ). МСК-ВВ выделяли методом ультрацентрифугирования, параметры везикул (морфологию, размеры, специфические маркеры, концентрацию и состав белков) охарактеризовали методами ТЭМ, вестерн-блоттинга, жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. Животные (n=15) были разделены на 3 группы: 1) животные без ПТБТ; 2) животные с ПТБТ; 3) животные с ПТБТ + МСК-ВВ. МСК-ВВ, содержащие 0,2 мг/мл белка в объеме 0,2 мл, однократно вводили в латеральную вену уха через 2 месяца после начала ПТБТ. Оценка эффективности терапии с использованием ВВ выполняли через 30 дней.

В составе протеома МСК-ВВ было идентифицировано 473 белка, включая биомаркеры ВВ (Hsp70, аннексины, CD63), белки, обладающие иммуномодулирующим действием (TGF β , IGF, Galectin), а также антимикробными свойствами (Hemoglobin subunit beta-2, Lactotransferrin, Lysozyme). Обнаружено, что для животных третьей группы характерен максимальный уровень содержания в плазме противовоспалительного цитокина IL-10 и минимальный уровень провоспалительных цитокинов INF- γ и TNF- α по сравнению с животными двух других экспериментальных групп. Было показано, что применение МСК-ВВ в комплексной ПТБТ существенно снижает уровень воспалительной реакции и тяжесть поражения почек. Таким образом, МСК-ВВ могут стать перспективным инструментом в комплексном лечении ТБ, а также других инфекционных заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008 и программы стратегического академического лидерства ДВФУ "ПРИОРИТЕТ-2030".

РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ НА МОДЕЛИ ДЕРМАЛЬНОГО ОЖОГА КРЫС: РЕЗУЛЬТАТЫ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

Ю.В. Юркевич^{1*}, А.С. Шабунин^{2,3}, К.Н. Родионова^{2,3}, А.Ю. Макаров², А.М. Федюк², А.Д. Нилов², Е.В. Чикулаева², Е.М. Приходько¹, Н.И. Енукашвили¹, А.И. Ильющенко¹, О.В. Супильникова¹, С.В. Виссарионов², Т.С. Рыбинских², Л.С. Конькова², И.С. Чустрак², А.С. Байдикова², П.А. Сафонов²

¹ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Центр клеточных технологий «Покровский» (г. Санкт-Петербург, Россия)

² Национальный медицинский исследовательский центр детской травматологии и ортопедии имени Г.И. Турнера (г. Санкт-Петербург, Россия)

³ Санкт-Петербургский Политехнический Университет Петра Великого
Yurkevich2@yandex.ru

Одним из перспективных направлений в комбустологии является применение раневых покрытий на основе культивированных клеток кожи. Проведение доклинических исследований специфической активности биомедицинских клеточных продуктов (БМКП), в состав которых входят клетки человека, предусматривает использование гомологичных моделей в опытах на лабораторных животных. В таких моделях при изготовлении БМКП клетки человека заменяют на соответствующие используемому виду животных. Данная работа посвящена экспериментальной оценке ранозаживляющей способности гомологичного БМКП на основе фибробластов крысы в составе геля гидроксипропилцеллюлозы в рамках доклинических испытаний на модели термического ожога III степени у крыс линии Wistar. Площадь термического ожога составляла 16 см². Через 1 сутки после нанесения ожога проводили радикальную некрэктомию, спустя 3 суток методом блочной рандомизации животные были разделены на 4 группы (контроль 1 – без лечения; контроль 2 - аппликация мази «Левомеколь»; контроль 3 - аппликация геля без клеточного компонента; основная группа – аппликация гомологичных фибробластов в составе геля гидроксипропилцеллюлозы). Во всех группах раневую поверхность дополнительно фиксировали индифферентным покрытием. Продолжительность лечения составила 5 суток, после чего раневые повязки были сняты. Планиметрически установлены отчетливые различия в темпах ранозаживления между основной и контрольными группами лабораторных животных на протяжении воспалительного и регенеративного периодов раневого процесса. Лечебный эффект мази «Левомеколь» проявлялся преимущественно в период и ранние сроки после нанесения. В последующие сроки индексы заживления от значений в контрольной группе 1 (без применения препаратов) значимо не отличались. Аппликация геля гидроксипропилцеллюлозы (контроль 3) не выявила значимых изменений в темпах заживления ожога. В основной группе установлен усиленный ранозаживляющий эффект гомологичных фибробластов, который поддерживался преимущественно в восстановительный период с достижением максимума к 30 суткам после ожога. С помощью цитологических и гистологических исследований была проведена оценка количественных и качественных показателей заживления ожоговых ран. При аппликации на ожоговую поверхность гомологичных фибробластов в гелевой среде выявлен преимущественно регенераторный тип цитограмм, характеризующийся значительным количеством полибластов и фибробластов в раневой области (в 3-3,5 раза больше по сравнению с контрольными группами). Биопсийные препараты основной группы исследования показали наличие зрелой грануляционной ткани и большого количества сосудов микроциркуляторного русла в период регенерации, что демонстрирует специфическую ранозаживляющую эффективность исследуемого клеточного продукта.

ВЛИЯНИЕ РЕЦЕПТОРОВ NOTCH3 и NOTCH4 НА ПРОФИБРОТИЧЕСКУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ ЛЕГОЧНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА

Д. Е. Ян^{1*}, Н.И. Бакаленко¹, Д. Смирнова¹, П. Д. Кучур¹, Л. М. Гайфулина¹, М.А. Атюков²,
А.Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

²Городская многопрофильная больница №2, Санкт-Петербург, 194354

daniela.yan.2003@gmail.com

В последние десятилетия накапливаются данные о роли NOTCH-сигналинга в развитии фиброза различных органов и тканей (почек, легких, кожи). У млекопитающих описано 4 рецептора NOTCH (NOTCH1-4) [1]. В настоящее время очень мало известно о специфичности вклада каждого из этих рецепторов в различные процессы, на которые влияет NOTCH-сигналинг [2]. Наименее исследованы NOTCH3 и NOTCH4.

Цель исследования: оценить влияние активации и инактивации рецепторов NOTCH3 и NOTCH4 на профибротическую трансформацию легочных фибробластов.

В работе использовали культуру лёгочных фибробластов человека, полученную в результате частичной резекции лёгкого. Профибротическую трансформацию запускали при помощи TGFβ1. NOTCH-зависимую активацию клеток осуществляли путем введения лентивирусного вектора, несущего внутренний домен NOTCH рецепторов (N3ICD и N4ICD). Инактивацию NOTCH проводили с помощью лентивирусных частиц, несущих шпилечные РНК shNOTCH3 и shNOTCH4. Также были получены транскриптомы легочных фибробластов, зараженных вирусными частицами с NOTCH3 и NOTCH4.

Нами было установлено, что активация N3-4ICD приводит к значительному усилению экспрессии ключевых маркеров фиброза - α-SMA, виментина и коллагенов. Этот эффект для NOTCH4 выражен заметно сильнее, чем для NOTCH3. Введение инактивирующих конструкций, напротив, снижает экспрессию этих маркеров, частично нейтрализуя влияние TGFβ1. Анализ транскриптомных данных показал, что добавление обоих рецепторов приводит к увеличению экспрессии маркеров фиброза, но с разной интенсивностью: при добавлении N4ICD количество профибротических маркеров больше, и рост их экспрессия значительнее, чем при добавлении N3ICD. Образцы с N4ICD обнаруживают на порядок больше дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ), чем образцы N3ICD. В образцах с N4ICD обнаружены ДЭГ, вовлеченные в регуляцию сигнальных путей WNT и TGFβ.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

1. Hu B, Phan SH. Notch in fibrosis and as a target of anti-fibrotic therapy. *Pharmacol Res.* 2016; 108:57–64.

2. DellAlbani P et al. Differential patterns of NOTCH1–4 receptor expression are markers of glioma cell differentiation. *Neuro Oncol.* 2014; 16(2): 204–216.

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ ОПУХОЛЕВОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ ПРИ ГЛИОБЛАСТОМЕ

Э.П. Янышева^{1*}, А.С. Бугакова¹, П.А. Мельников¹, М.В. Ширманова³, В.П. Баклашев^{1,2},
Г.М. Юсубалиева^{1,2}

¹ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА, Москва, 115682

² Федеральное государственное бюджетное учреждение Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, 117513

³ Приволжский национальный исследовательский медицинский университет, Н. Новгород, 603005 Россия

*ElviraY2000@yandex.ru

Глиобластома (мультиформная глиобластома, ГМБ) – наиболее распространенная и агрессивная опухоль головного мозга, характеризующаяся высокой летальностью. Сравнительная резистентность глиобластомы к разным видам терапии вызвана гетерогенностью опухоли и высоко иммуносупрессивным микроокружением. Регуляторные Т-клетки представляют собой один из ключевых компонентов иммуносупрессии при глиобластоме.

Работа выполнена на трансгенной линии мышей C57Bl/6-FoxP3EGFP, созданной на основе линии C57BL/6 (виварий НИИ ЭО и БМТ, Нижний Новгород) [1], [2]. Мышам моделировали экспериментальную ортотопическую глиобластому (Stereotaxis, RWD). С момента моделирования методом интравитальной микроскопии (Nikon Eclipse Ti-E) отслеживали лимфоцитарную инфильтрацию в процессе динамического роста глиомы с помощью внутривенного введения маркеров субпопуляций лимфоцитов [3]. Дополнительно, микроокружение оценивали на извлеченных TILs методом проточной цитометрии. Процент привлеченных CD4-позитивных клеток составил 71%, из них по FoxP3EGFP определили не более 4%. TILs были извлечены в стерильных условиях с целью поддержания полученной культуры Treg in vitro и длительного исследования свойств. Понимание разнообразных ролей Treg может открыть новые возможности для скрининга глиобластомы и внести коррективы в терапевтические подходы.

Работа финансирована из средств гранта РНФ (№21-74-20110) и ГЗ ФМБА России («Персонализированная платформа для постоперационной иммунотерапии глиобластом»).

1. Izosimova, A.V.; Shirmanova, M.V.; Shcheslavskiy, V.I.; Sachkova, D.A.; Mozherov, A.M.; Sharonov, G.V.; Zagaynova, E.V.; Yuzhakova, D.V. FLIM of NAD(P)H in Lymphatic Nodes Resolves T-Cell Immune Response to the Tumor. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 15829. <https://doi.org/10.3390/ijms232415829>

2. Dipica Haribhai, Wen Lin, Lance M. Relland, Nga Truong, Calvin B. Williams, Talal A. Chatila; Regulatory T Cells Dynamically Control the Primary Immune Response to Foreign Antigen1. J Immunol 1 March 2007; 178 (5): 2961–2972. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2961>

3. Quatromoni, J.G., Morris, L.F., Donahue, T.R. et al. T cell receptor transgenic lymphocytes infiltrating murine tumors are not induced to express foxp3. J Hematol Oncol 4, 48 (2011). <https://doi.org/10.1186/1756-8722-4-48>

Стендовые доклады

БАРИАТРИЧЕСКАЯ ОПЕРАЦИЯ СПОСОБСТВУЕТ СНИЖЕНИЮ АДИПОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С СД2Т И ПОДДЕРЖАНИЮ ЛИПОЛИТИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА БЕЛЫХ И БЕЖЕВЫХ АДИПОЦИТОВ

М.Ю. Агарёва^{1,*}, Ю.С. Стафеев¹, С.С. Мичурина^{1,2}, М.А. Болдырева^{1,3}, Е.А. Шестакова⁴, А.О. Гаврилова⁴, М.С. Синеокая⁴, М.Ю. Меньшиков¹, Е.В. Парфёнова^{1,2}, М.В. Шестакова⁴

¹ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова" МЗ РФ, Москва, 121552

²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000

⁴ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии" МЗ РФ, Москва, 117292

* amarrgo1999@gmail.com

Мезенхимальные стволовые клетки подкожной жировой ткани (МСК пЖТ) могут дифференцироваться в белом и бежевом адипогенных направлениях. При этом белые адипоциты обеспечивают хранение избытка питательных веществ в виде триглицеридов, а бежевые адипоциты сжигают запасенные триглицериды в процессе термогенеза. Сахарный диабет 2 типа (СД2Т) ассоциирован с нарушением адипогенного потенциала МСК пЖТ. Бариатрическая хирургия представляет собой актуальную модель быстрого снижения веса в сочетании с метаболическими и воспалительными улучшениями. В большинстве случаев бариатрическая операция (БО) приводит к ремиссии СД2Т и изменению морфологии жировой ткани. Однако в настоящее время нет работ, изучающих изменение свойств МСК пЖТ после БО. Поэтому целью нашей работы было исследование влияния бариатрической операции на адипогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток подкожной жировой ткани пациентов с сахарным диабетом 2 типа.

В экспериментах использовали МСК, полученные из подкожной пЖТ пациентов с СД2Т до бариатрической операции и спустя полгода после бариатрической операции (пациенты с ИМТ > 35 кг/м², длительность ожирения более 10 лет). Дифференцировку адипоцитов в белом и бежевом направлениях осуществляли в течение 21 дня по стандартному протоколу. Размер липидных капель оценивали с помощью красителя BODIPY493/503. Содержание основного маркера адипогенеза FABP4, маркеров воспаления pJNK-T183/Y185, tJNK и RAGE, а также маркера бежевой дифференцировки UCP-1 оценивали методом иммуноблоттинга.

В результате белого и бежевого адипогенеза было обнаружено увеличение количества мелких капель, при этом содержание адипоцитов в поле зрения и маркера адипогенеза FABP4 снижалось после БО. Экспрессия UCP1 не изменялась в бежевых адипоцитах после БО. Содержание pJNK-T183/Y185 увеличивалось в случае белой дифференцировки после БО, а содержание RAGE статистически значимо не изменялось и при белой, и при бежевой дифференцировках.

Мезенхимальные стволовые клетки, полученные после бариатрической операции из подкожной жировой ткани пациентов с СД2Т, характеризуются сниженным адипогенным потенциалом в белом и бежевом направлениях по сравнению с МСК пЖТ пациентов до бариатрической операции. При этом белые и бежевые адипоциты, дифференцированные из МСК пЖТ после бариатрической операции, обладают повышенным уровнем липолитической активности по сравнению с адипоцитами, полученными из МСК пЖТ пациентов до бариатрической операции.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда 22-15-00365.

СНИЖЕНИЕ ЭКСАЙТОТОКСИЧНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛУТАМАТА НА НЕЙРОНАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СЕКРЕТОМА АЛЛОГЕННЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПРОИЗВОДНЫХ НЕРВНОГО ГРЕБНЯ

С.Р. Адешелидзе, Т.Е. Гетманова, Н.Н. Диденко*

ФГБОУ ВО Ставропольский государственный медицинский университет МЗ РФ,
Ставрополь, Россия, 355017

* nikolai.n.didenko@gmail.com

Будучи важным эндогенным нейромедиатором, глутамат выполняет различные физиологические функции в центральной нервной системе [1]. Тем не менее, за счет своей эксайтотоксичности, накопление глутамата может приводить к повреждению нейронов и гибели клеток, что играет важную роль в патогенезе болезней Альцгеймера и Паркинсона, инсульта и многих других нейродегенеративных заболеваний [2].

Благодаря своей легкодоступности и высокой пластичности, стволовые клетки производные нервного гребня (NCSCs) взрослого организма представляют собой перспективный объект для использования в регенеративной медицине [3]. При этом, применение их внеклеточных продуктов жизнедеятельности представляется более биологически безопасным.

Материал и методы. Исследование проводили на клетках нейробластомы мыши линии Neuro-2a. Клетки культивировали на 24-луночных планшетах в среде DMEM с добавлением 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 10% FBS при 37°C и 5% CO₂. Для индуцирования нейродегенерации в среду вводили 10 ммоль/л глутамата на 24 ч.

Для получения секретома первичные культуры NCSCs мыши на 3 пассаже помещали в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч, после чего супернатант отбирали для дальнейшей его фильтрации и центрифугирования.

Пролиферативную активность клеток определяли с помощью набора EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ. Измеряли оптическое поглощение раствора с использованием многофункционального фотометра-имиджера Cytation1 (BioTek) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм, и выражали в % относительно контроля.

Результаты. После действия глутамата жизнеспособность клеток значительно снижалась из-за развития апоптоза и некроза и составляла 56,62%±2,686% относительно контроля ($t=8,761$, $p<0,001$). При одновременном введении в среду секретома NCSCs жизнеспособность возрастала более чем на 20% и составляла 121,17%±7,430% относительно клеток, на которые воздействовали только глутаматом ($t=2,486$, $p<0,05$). Жизнеспособность клеток, в среду для которых вводили только секретом NCSCs, была ниже контрольных значений (81,05%±8,610%), однако достоверно от них не отличалась ($t=1,982$, $p>0,05$).

Заключение. Полученные данные позволяют предположить наличие нейропротективного действия секретома NCSCs, сопоставимого с ранее полученными результатами на других моделях. Результаты исследования могут стать основой для дальнейшей разработки новых методов терапии нейродегенеративных заболеваний.

1. Mao Q.Q., Zhong X.M., Feng C.R., Pan A.J., Li Z.Y., Huang Z. Protective effects of paeoniflorin against glutamate-induced neurotoxicity in PC12 cells via antioxidant mechanisms and Ca(2+) antagonism. *Cell Mol Neurobiol* 2010; 30: 1059-1066.
2. Abushik P.A., Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. 2013. Kainate-induced calcium overload of cortical neurons in vitro: dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain. *Cell Calcium*. 54 (2), 95–104.
3. Zeuner M.T., Didenko N.N., Humphries D., Stergiadis S., Morash T.M., Patel K., Grimm W.D., Widera D. Isolation and Characterization of Neural Crest-Derived Stem Cells From Adult Ovine Palatal Tissue. *Front Cell Dev Biol*. 2018 Apr 11;6:39.

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НЕЙРОТРОФИНА-3 НА ПРЯМО РЕПРОГРАММИРОВАННЫЕ НЕРВНЫЕ КЛЕТКИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКИ И КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ SK-N-BE.

Е. А. Архиреева^{1*}, С.М. Кузнецова², Д.А. Чудакова¹, Г.М. Юсубалиева^{1,2}, В.П. Баклашев^{1,2}

¹Федеральный центр мозга и нейротехнологий ФМБА России, Москва, 117513

²Федеральный научно-клинический центр специализированных видов ФМБА России, Москва, 115682 Россия

* katerina.andreevna.mos98@list.ru

Нейротрофин-3 (NT-3) – один из белков семейства нейротрофинов, стимулирует рост симпатических и сенсорных нейронов, регулирует выживание, дифференцировку и пролиферацию клеток различных популяций в тканях центральной и периферической нервной системы. Благодаря своим хемотрофическим свойствам способствует аксональному росту нейронов [1, 2].

При тяжелых патологических состояниях не наблюдается достаточной регенерации тканей. Экзогенное введение, факторов роста, в частности, NT-3, может оказать существенное содействие приживлению прямо репрограммированных нейрональных клеток, стимулировать нейрогенез, способствуя процессам заживления, росту аксонов и формированию новых синапсов в месте травмы [2, 3]. Целесообразно будет изучить воздействие NT-3 на аксональное восстановление клеток в условиях *in vitro*. Работа была выполнена на двух клеточных линиях: SK-N-BE(2) – клеточная линия нейробластомы, созданная в 1972 году на основе биопсии костного мозга, используемая в неврологических исследованиях и линии drNPC (direct reprogrammed Neural Progenitor Cells), полученных по протоколу Jan Eric Affort.

Для выявления воздействия клетки SK-N-BE и культивировали в планшете с адгезивной поверхностью в полной ростовой среде DMEM/F12 + 10% FBS + 1% pen-strep, а клетки drNPC – в планшете, дно лунок которого было покрыто матригелем Matrigel Matrix, в среде Neurocult + 10% Supplement Ns-A + 1% pen-strep + FGF2 + EGF. После постепенного удаления в процессе культивирования факторов, способствующих пролиферации и росту аксонов, наблюдали значимые изменения в морфологии клеток, укорочения длины отростков, местами снижения адгезионных свойств. Затем добавляли в динамической концентрации NT-3 и наблюдали его дозозависимый эффект. В качестве контролей использовались клетки, выращиваемые в чистой среде или с добавлением различных комбинаций питательных компонентов.

Результаты анализировались с помощью приборов EVOS M7000 Imaging System, Icelligence и CellInsight CX7 LED Pro HCS Platform.

Работа финансирована ГЗ ФМБА Нейромат.

1. R Grill 1, K Murai, A Blesch, F H Gage, M H Tuszynski. Cellular delivery of neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. J Neurosci. 1997 Jul 15;17(14):5560-72.
2. Hawryluk G.W.J. et al. In Vitro Characterization of Trophic Factor Expression in Neural Precursor Cells // Stem Cells Dev. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2012. Vol. 21, № 3. P. 432–447.
3. Jimena Bouzas-Rodriguez 1, Jorge Ruben Cabrera, Céline Delloye-Bourgeois, Gabriel Ichim, Jean-Guy Delcros, Marie-Anne Raquin, Raphaël Rousseau, Valérie Combaret, Jean Bénard, Servane Tauszig-Delamasure, Patrick Mehlen Neurotrophin-3 production promotes human neuroblastoma cell survival by inhibiting TrkC-induced apoptosis. J Clin Invest. 2010 Mar;120(3):850-8.

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ КОНТАМИНАЦИИ МИКОПЛАЗМАМИ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКС-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Р.В. Афанасьев^{1,3,*}, А.И. Соловьева¹, Д.С. Зилов^{1,2}, И.Е. Вишняков¹, Н.И. Енукашвили^{1,4}

¹ Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

² Университет ИТМО, международный научный институт "Растворная химия передовых материалов и технологий", г. Санкт-Петербург, 191002

³ ФГАОУ ВО "Тюменский государственный университет", Тюмень, 625003

⁴ Центр клеточных технологий «Покровский», г. Санкт-Петербург, 199106

*albus2646@gmail.com

Микоплазмы широко распространены в природе как паразиты человека, млекопитающих, рептилий, рыб, членистоногих и растений. Они могут быть симбионтами изопод, певчих птиц, рыб и даже глубоководных кораллов из Мексиканского залива и норвежских фьордов. Мелкий размер позволяет им беспрепятственно проходить сквозь фильтры с диаметром пор 0.22 мкм, которые используются для стерилизации растворов в клеточной биологии и контаминировать клеточные культуры. Избавиться от микоплазм довольно тяжело, поэтому существует много способов детекции заражения на ранних стадиях. Одним из наиболее чувствительных методов обнаружения этих бактерий является метод ПЦР в реальном времени. На сегодняшний день разработано довольно много наборов детекции, почти у всех таргетным является ген 16S рибосомальной РНК. Однако не у всех видов микоплазм этот ген представлен единственной копией в геноме, что несколько усложняет расчеты количества геномов.

Мы провели поиск наиболее консервативных однокопийных генов в 248 геномах молликут. В результате мы отсортировали 15 генов, по которым провели реконструкцию филогении, чтобы проверить, подходит ли ген для идентификации вида микоплазм. Из 8 генов, использование которых дало правильные филогенетические деревья, мы выбрали ген *dnaA*, кодирующий фактор инициации репликации ДНК. Далее мы подобрали праймеры к 15 видам наиболее распространенных микоплазм и разбили их на два сета во избежание образования кросс-димеров: *Mycoplasma gallisepticum*, *M.genitalium*, *M.pneumoniae*, *M.hominis*, *M.hyorhinae*, *M.arginini*, *M. orale*, *M. fermentans*, *M. mycoides*, *M.genitalium*, *Ureaplasma urealitycum*, *Acholeplasma laidlawii*, *M.hyo pneumoniae*, *M.synoviae*, *M.salivarium*. Праймеры проверили на специфичность к таргетным видам и определили степень чувствительности (концентрации ДНК бактерий, по которым возможно определить присутствие контаминанта в образце). Определили, что для большинства протестированных видов порог чувствительности праймеров составляет 10^{-5} нг/мкл, что соответствует в среднем от 6 до 13 копий геномов микоплазм в ПЦР-реакции.

Работа поддержана грантом БРК (проект 15.БРК.21.0011, соглашение № 075-15-2021-1063).

РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТЫ ПРОДУКТА НА ОСНОВЕ АЛЛОГЕННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

О.В. Супильникова^{1,3}, В.В. Багаева^{1,3*}, Т.Л. Золина¹, А.И. Ильющенко, А.В. Котова^{1,3}, А.И. Конкина¹, Н.И. Енукашвили^{1,3}, Е.М. Приходько¹, Ю.В. Юркевич¹, Е.В. Зиновьев²,

¹ ООО «Покровский банк стволовых клеток», Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, Россия

² НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе, Санкт-Петербург, Россия

³ Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

* bagvar@mail.ru

Количество ожоговых больных в НИИ скорой помощи им И.И. Джанелидзе составляет в среднем 1200 в год, из них тяжелообольных около 400 пациентов, а 34% людей в мире страдают длительно незаживающими ранами, пролежнями и такими болезнями кожи. Значительная распространенность травматических поражений кожи, ожоговых травм, долго незаживающих ран определяют необходимость разработки и внедрения в клинику клеточного продукта на основе аллогенных фибробластов. Поэтому была поставлена задача по разработке БМКП на основе фибробластов с перспективой увеличения качества лечения, уменьшению инвалидизации пострадавших, уменьшения затрат на лечение и сокращения койко-дней.

В нашем Центре клеточных технологий «Покровский» была полностью разработана биотехнологическая карта получения аллогенных фибробластов и продукта на их основе. Для соответствия ФЗ-180 и «Правилам надлежащей практики» была разработана карта обследования донора, добровольное информированное согласие, разработаны правила проведения входного контроля поступающего биоматериала, разработан паспорт культуры, в состав которого входят протоколы по выделению, культивированию, иммунофенотипированию, анализу культуры на кариотип, STR-профилированию, контроль бактериальной и вирусной контаминации. Разработана система программного замораживания в карантинное хранилище с последующим переносом на долгосрочное хранение с документальным оформлением каждого этапа. Также были разработаны соответствующие документы и точки контроля для производства носителя. Разработаны технологическая карта и аппаратная схема.

Таким образом, разработанный нами полный цикл производства позволяет начать доклинические исследования разработанного БМКП с целью подачи заявки на проведение клинических исследований.

ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ СОМАТОТРОПНОГО ГОРМОНА НА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЙ Ca^{2+} В КЛЕТКАХ ГРАНУЛЕЗЫ ОВАРИАЛЬНЫХ Фолликулов BOS TAURUS

Е.И. Баранова*, В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина

ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста"

* elenabaranova666@gmail.com

Клетки гранулезы овариальных фолликулов используются при моделировании состава сред для получения нативных и реконструированных эмбрионов сельскохозяйственных животных. Действие СТГ (соматотропного гормона) направлено на регуляцию механизмов роста, дифференциации, а также других функций, в том числе гаметогенеза и стероидогенеза гонад. В ооцитах, созревших в присутствии СТГ и гранулезных клеток, отмечается рост дыхательной активности митохондрий и снижение кальция во внутриклеточных депо [1]. При созревании ооцитов коров СТГ увеличивает концентрацию цитоплазматического кальция в кумулюсных клетках [2]. Цель работы - изучение действия СТГ на цитоплазматический кальций в клетках гранулезы коров. В экспериментах использовали яичники коров на стадии фолликулярного роста. Клетки гранулезы извлекали из фолликулов коров диаметром 3-6 мм. Для измерения цитоплазматического кальция использовали флуоресцентный зонд Флуо-3АМ в концентрации 5 мкМ. Измерение в клетках гранулезы интенсивности флуоресценции цитоплазматического кальция проводили на спектрофлуориметре Hitachi. Величина длины волны возбуждения и излучения для Флуо-3АМ равнялась 506 и 526 нм, соответственно. В отсутствие внеклеточного увеличения концентрации цитоплазматического кальция в клетках происходит вследствие его освобождения из внутриклеточных депо. В бескальциевой среде было показано, что использование СТГ в концентрации 1 и 100 нг/мл приводило к росту количества цитоплазматического кальция, которое было одинаковым при использовании обеих концентраций гормона. Инкубация клеток гранулезы в присутствии ингибитора протеинкиназы С соединения Ro 31-8220 в концентрации 10 нг/мл приводила к росту концентрации цитоплазматического кальция. Обработка клеток ингибитором протеинкиназы С в отсутствие внеклеточного кальция и последующее действие на гранулезу СТГ в концентрации 1 или 100 нг/мл не вызывало увеличения концентрации кальция в цитоплазме клеток в сравнении с действием СТГ в отсутствие ингибитора. В присутствии внеклеточного кальция (2 мМ) использование СТГ в концентрации 1 или 100 нг/мл приводило к увеличению концентрации кальция в цитоплазме клеток, причем эти показатели значительно превышали аналогичные, полученные в бескальциевой среде. Воздействие на клетки ингибитора протеинкиназы С и последующее добавление СТГ приводило к росту концентрации цитоплазматического кальция только при использовании гормона в концентрации 100 нг/мл, тогда как на действие СТГ в концентрации 1 нг/мл ингибитор не оказывал влияние. Таким образом, полученные данные позволяют предположить, что действие различных концентраций СТГ на цитоплазматический кальций в клетках гранулезы коров осуществляется через различные внутриклеточные механизмы.

Работа выполнена в рамках проекта № 22-16-00084, поддержанного Российским Научным Фондом

1. Kuzmina T., Alm H., Denisenko V., Tuchscherer A., Kanitz W., Torner H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence in vitro. J Reprod Dev. 2007. 53(2):309-316.
2. Silvestre F., Fissore R.A., Tosti E., Boni R. Ca^{2+} rise at in vitro maturation in bovine cumulus-oocyte complexes. Mol. Reprod. Dev. 2012. 79(6) 369-379.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК МЕЗЕНХИМНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ СО-КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Л.С. Басович^{1,2,*}, Д.А. Переpletчикова¹, А.Б. Малашичева¹

¹ Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064 Россия

² Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, 197101 Россия

* L.Basovich@yandex.com

Внутриклеточный сигнальный путь Notch регулирует развитие и дифференцировку многих типов тканей и влияет на основные клеточные процессы, такие как пролиферация, дифференцировка и апоптоз. У млекопитающих продуцируются четыре различных рецептора Notch (Notch 1, 2, 3, 4) и 5 лигандов типа Delta (Delta like 1, 3, 4 и Jagged 1, 2). Взаимодействие рецептора Notch с лигандом вызывает протеолитическое отщепление внутриклеточного домена Notch рецептора (NICD), который транспортируется в ядро и взаимодействует с транскрипционными факторами семейства Csl.

Активация NICD в эндотелиальных клетках усиливает остеогенную дифференцировку клеток мезенхимного происхождения при их со-культивировании. Напротив, со-культивирование модифицированных эндотелиальных клеток методом РНК-интерференции гена Csl ослабляет остеогенную дифференцировку в мезенхимных клетках.

Целью исследования являлся анализ влияния подавления компонентов сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках на остеогенную дифференцировку в эндотелиально-мезенхимных со-культурах. В качестве клеток мезенхимного происхождения использовались культуры первичных остеобластов различных доноров в со-культивировании с клетками эндотелия пупочной вены человека (HUVECs). Эндотелиальные клетки были модифицированы путем трансдукции лентивирусами, кодирующими короткую шпилечную РНК компонентов сигнального пути Notch: *NOTCH1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *NOTCH4*, *JAG1*, *DLL4*, *MAML1*, *MAML2*, *MAML3*. Запуск остеогенной дифференцировки осуществлялся по стандартному протоколу добавлением 100 нМ дексаметазона, 50 мкМ аскорбиновой кислоты и 10 мМ β-глицерофосфата в питательную среду. Остеогенную дифференцировку анализировали с помощью окраски ализариновым красным и методом количественной ПЦР.

Нокдаун рецепторов *NOTCH1-4*, лигандов *JAG1*, *DLL4*, а также *MAML1-3* в эндотелиальных клетках в разной степени подавляет остеогенную дифференцировку остеобластов при их со-культивировании. Большой ингибирующий эффект оказывает нокдаун *NOTCH3*, *4* и *MAML1*.

Таким образом, модификации сигнального пути Notch в эндотелиальных клетках могут выступать регулятором остеогенной дифференцировки со-культивируемых клеток мезенхимного происхождения.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕКРЕТИРУЕМЫХ ГЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ-ПРЕДШЕСТВЕННИКАМИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА В МОДЕЛИ ВОСПАЛЕНИЯ

А.К. Судьина^{1,2}, Е.В. Белоусова*^{1,2}, М.О. Шеденкова^{1,2,3}, Д.В. Гольдштейн^{1,2}, Д.И. Салихова^{1,2}

¹НИИ молекулярной и клеточной медицины, ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, 117198

²Медико-генетический научный центр, Москва, 115522

³Факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991

*email: ekaterina.belousova.2017@gmail.com

Введение: черепно-мозговая травма (ЧМТ) - распространенная неврологическая патология, при которой повреждаются ткани головного мозга [1]. Поврежденные клетки продуцируют сигнальные молекулы, приводящие к активации провоспалительной микроглии и астроцитов, высвобождающих NO [2], [3]. Для снижения воспаления при ЧМТ могут быть использованы биологически активные вещества, секретируемые стволовыми/прогениторными клетками, в том числе в составе внеклеточных везикул (ВВ).

Материалы и методы: ВВ и комплекс секретируемых белков (КСБ) получали из глиальных клеток-предшественников (ГКП), дифференцированных из ИПСК человека. Для получения ВВ кондиционированную среду центрифугировали при 10 000 g 30 минут, а затем дважды - 1,5 часа при 108 000 g на ультрацентрифуге Avanti JNX-30 (Beckman Coulter Inc., США). Для получения КСБ кондиционированную среду пропускали через фильтры Amicon Ultra 100 кДа и 3 кДа (Millipore, Германия). Моделирование воспаления проводили на первичной культуре астроцитов и микроглии с добавлением 500 мкг/мл липополисахарида (ЛПС). ВВ и КСБ добавляли одновременно с ЛПС, секрецию NO определяли через 24 часа с помощью реакции Грисса. Статистический анализ выполняли в SigmaPlot 12.5. Отличия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

Результаты: в физиологических условиях ВВ в концентрации 3 мкг/мл статистически значимо снижали концентрацию NO по сравнению с контролем (принят за 100 %) до $55,914 \pm 12,022$ %, а 10 мкг/мл - до $44,493 \pm 11,721$ %. Добавление КСБ в концентрации 15 мкг/мл статистически значимо уменьшало концентрацию NO по сравнению с контролем до $43,833 \pm 10,856$ %, а 45 мкг/мл - до $25,507 \pm 3,830$ %. При ЛПС-индуцированном воспалении КСБ в концентрации 15 мкг/мл статистически значимо снижал NO до 76,15 (65,78; 85,44) %, а 45 мкг/мл - до 73,61 (63,68; 94,06) %. ВВ не показали статистически значимой эффективности при воспалении.

Заключение: таким образом, КСБ (15, 45 мкг/мл) и ВВ (3, 10 мкг/мл) снижают концентрацию NO в физиологических условиях. При этом КСБ (15, 45 мкг/мл) снижает концентрацию NO также на модели воспаления с ЛПС, что позволяет предположить, что применение КСБ и ВВ из ГКП является новым способом противовоспалительной терапии при неврологических патологиях, в том числе ЧМТ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (проект № КБК 075 0110 47 1 S7 24600 621) по теме «Разработка новых лекарственных средств для терапии неврологических заболеваний».

1. Ghajar J. Traumatic brain injury // Lancet. 2000. V. 356. No. 9233. P. 923–9.
2. Greve M. W., Zink B. J. Pathophysiology of traumatic brain injury // Mt. Sinai. J. Med. 2009. V. 76. No. 2. P. 97–104.
3. Block M. L., Hong J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism // Prog. Neurobiol. 2005. V. 76. No. 2. P. 77-98.

РАЗРАБОТКА МОРФОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ

А.К. Бережной^{1*}, М.М. Слотвицкий¹, А.И. Калинин¹, В.Д. Наумов¹, В.А. Цвеляя¹

¹ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Лаборатория экспериментальной и клеточной медицины МФТИ, Долгопрудный, 140180, Россия

* berezhnoi.ak@phystech.edu

В Лаборатории экспериментальной и клеточной медицины Московского физико-технического института проводятся исследования зрелых [1] кардиомиоцитах, которые получают из стволовых клеток человека. Эти клетки используют для тестирования лекарств и изучения механизмов возникновения аритмий. Считается, что эти клетки больше всего похожи на реальные кардиомиоциты человека по своим электрофизиологическим свойствам.

Основная цель работы - создать модель сердечной ткани, полученной из ИПСК, которая бы учитывала как морфологические, так и электрофизиологические характеристики клеток. Для получения человеческих кардиомиоцитов используется протокол Gi-Wi, который заключается в активации и блокировании определенного сигнального пути. Жизнеспособность клеток и их связанность оцениваются с помощью оптического картирования, потенциалзависимого и кальциезависимого. После оценки электромеханического сопряжения имплантированных клеток образец подвергается иммуноцитохимическому исследованию на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 710.

Обработка экспериментальных данных проводилась с помощью программного обеспечения ImageJ.

Экспериментальные данные обрабатывались с помощью программы ImageJ. Моделирование морфологии ткани выполнялось на CPU Intel Core i7, а объединение морфологической и электрофизиологической моделей осуществлялось с помощью Wolfram Mathematica.

Сначала были собраны данные для валидации клеточной модели: кардиомиоциты выращены из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), доведены до зрелого состояния и исследованы разными методами, включая оптическое картирование для определения степени электрофизиологической связи между клетками и конфокальную микроскопию для определения маркеров зрелости клеток. Собрана статистика по фенотипу кардиомиоцитов и фибробластов, достаточная для исследований. Затем эти данные были проанализированы для получения набора фенотипических параметров клеток.

Затем эти данные использовались для определения конкретных фенотипических параметров клеток, таких как площадь, линейные размеры и другие величины.

1. Mihail Slotvitsky, Valeria Tsvelaya, Sheida Frolova, Elena Dementyeva, Konstantin Agladze, Arrhythmogenicity Test Based on a Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Cardiomyocyte Layer, *Toxicological Sciences*, Volume 168, Issue 1, March 2019, Pages 70–77, <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy274>
2. Kudryashova N, Nizamieva A, Tsvelaya V, Panfilov AV, Agladze KI (2019) Self-organization of conducting pathways explains electrical wave propagation in cardiac tissues with high fraction of non-conducting cells. *PLoS Comput Biol* 15(3): e1006597. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006597>

ВОЗМОЖНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АЛЛОГЕННЫХ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ДЛЯ ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ ГИАЛИНОВОГО ХРЯЩА

М.С. Божокин^{1,2*}, Д.М. Марченко¹, Нащекина Ю.А¹, Е.Р. Михайлова¹, М.Г. Хотин¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

² ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена», Санкт-Петербург

*writeback@mail.ru

Гиалиновый хрящ (ГХ) представляет собой специфическую соединительную ткань, покрывающую поверхность крупных суставов и обладающую ограниченными способностями к регенерации. Восстановление повреждений ГХ является актуальной проблемой для миллионов людей во всем мире. Одним из перспективных решений данной проблемы является применение методов тканевой инженерии, включающее в себя использование биodeградируемого скаффолда и предварительно модифицированной культуры клеток. Активация дифференцировки клеток в хондрогенном направлении и последующая их имплантация в зону повреждения, способна стимулировать регенерацию, в том числе за счет паракринного эффекта. В данной работе проведено сравнительное исследование возможности использования дермальных фибробластов в составе ткане-инженерной конструкции (ТИК) для регенерации гиалинового хряща, как легко доступных клеток стромы, а также поиск наиболее эффективных подходов к их модификации в хондрогенном направлении.

Проведена оценка эффективности использования ТИК на основе дермальных фибробластов человека линии DF2 (Центр коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» ИНЦ РАН) и полилактидного скаффолда для регенерации ГХ *in vivo* на кроликах. В экспериментальной группе осуществляли имплантацию ТИК, контрольную группу оставляли без изменений. Анализ результатов производили с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и гистологических методов исследования через 90 суток после повреждения сустава и внесения ТИК.

В контрольной группе выявлен увеличившийся дефект поверхности сустава с повреждением гиалинового хряща и субхондальной кости без признаков восстановления. В экспериментальной группе обнаружена зона регенерации, покрытой фиброзной капсулой соединительной ткани и с включениями кластеров хондроцитов. Таким образом показана возможность использования дермальных фибробластов в составе ТИК для регенерации гиалинового хряща.

Проведено сравнительное исследование различных подходов для индукции хондрогенеза в дермальных фибробластах. Проведено два способа модификации клеток – посредством экзогенного рекомбинантного белка TGF- β 3 и сверхэкспрессии гена *Sox9*. Транскрипционный фактор SOX9 играет важную роль в процессе формирования гиалинового хряща. TGF- β 3 это ключевой сигнальный белок для индукции хондрогенеза. Для реализации сверхэкспрессии гена в клетках был разработан рекомбинантный лентивирусный вектор, содержащий кодирующую последовательность гена *Sox9*. Результаты модификации оценивали контролируя экспрессию генов, ассоциированных с хондрогенной дифференцировкой (*Tgf- β 3*, *Col2a1*, *Acan*, *Comp*).

Обнаружено, что добавление в питательную среду белка TGF- β 3 вызывает значительный рост экспрессии генов (до 20X), ассоциированных с процессом хондрогенеза, в дермальных фибробластах человека по сравнению с контрольным клетками. Трансдукция DF2 полученными лентивирусами, с последовательностью гена *Sox9*, также увеличивала экспрессию генов, ассоциированных с хондрогенезом (до 10X), по сравнению с контрольной культурой DF2. Последующие исследования планируется направить на оценку эффективности использования ТИК с модифицированными фибробластами.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЫХОДА ВНЕКЛЕТОЧНЫХ И ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ

А.А. Будюкова^{1,*}, С.В. Сабирова¹, М.О. Гомзикова¹

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

*e-mail: budyukova.02@gmail.com

Терапия с помощью мезенхимальных стволовых клеток (МСК) сопряжена с определенными рисками. Однако внеклеточные везикулы (ВВ), высвобождаемые МСК, сохраняют терапевтический потенциал исходных клеток, не неся риска онкотрансформации, и считаются более безопасным терапевтическим инструментом. Основным препятствием для внедрения ВВ в клиническую практику является их ограниченный выход. Метод, разработанный Pick et al. позволяет получать индуцированные микровезикулы с помощью цитохалазина В (МВ-ЦВ) в большом количестве путем блокирования полимеризации актиновых филаментов цитоскелета [1]. Ранее было показано, что индуцированные везикулы обладают сходным с родительскими клетками содержанием и иммунофенотипом, а также проявляют ангиогенную активность. Однако сравнения количественного выхода ВВ и МВ-ЦВ до сих пор не проводилось. Поэтому мы оценили выход и провели сравнительный анализ внеклеточных и индуцированных цитохалазином В микровезикул.

МСК были получены из жировой ткани мыши с использованием коллагеназы II. Выделенные клетки использовали для получения МВ-ЦВ, а кондиционированную среду использовали для сбора ВВ. Были проанализированы осадки, полученные после центрифугирования при 2300×g, 10 000×g и 100 000×g.

Для получения МВ-ЦВ клетки обрабатывали 10 мкг/мл цитохалазина В (C6762, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в течение 30 мин (37 °С, 5% CO₂). Затем суспензию клеток вортексировали в течение 30 сек и подвергали последовательному центрифугированию при 300×g в течение 5 мин, 300×g в течение 10 мин, 2300×g в течение 25 мин, 10 000×g в течение 45 мин при 4 °С и 100 000×g в течение 90 мин при 4 °С. Выход ВВ и МВ-ЦВ оценивали по количественному содержанию везикул с помощью проточной цитометрии.

Мы обнаружили, что среднее количество ВВ и МВ-ЦВ, полученных после центрифугирования при 2300g, составило 26 000±8485 событий/мин и 8166±23 116 соответственно (p=0,015), при 10 000g – 9333±5132 событий/мин и 69 000±26 870 событий/мин соответственно (p=0,026), при 100 000g – 34 500±16 263 событий/мин и 7300±1697 событий/мин соответственно (p=0,27). Количество МВ-ЦВ превышало количество ВВ после центрифугирования при 2300g в 3,1 раза (p = 0,05) и после центрифугирования при 10 000g в 7,4 раза (p = 0,027). Однако после центрифугирования при 100 000g количество ВВ превышало количество МВ-ЦВ в 4,7 раза.

Мы обнаружили, что протокол обработки клеток цитохалазином В увеличивает выход везикул (при 2 300g и 10 000g) и позволяет выделить везикулы за короткое время. Тенденция к обнаружению большего количества ВВ после центрифугирования при 100 000g может быть связана с присутствием в осадке ВВ везикул меньшего размера.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Правительства РФ «Привлечение ведущих ученых в вузы России» (грант 075-15-2021-600) и Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

1. Pick H., Schmid E.L., Tairi A.P., et al. // J. Am. Chem. Soc. 2005. V. 127. P. 2908–2912.

ПОЛУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПЕРВИЧНЫХ ЛИНИЙ ГЛИОМ ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРОЦЕССОВ ОНКОГЕНЕЗА

Е.Р. Вольф¹, Т.А. Шнайдер², Е.В. Ступак³, С.А. Чечеткина¹, И.Е. Пристяжнюк²

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», Новосибирск, 630090

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, 630090

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации
volf.katya.0308@gmail.com

Глиомы – это крайне агрессивные опухоли, которые характеризуются высокой степенью гетерогенности, из-за чего применяемое лечение не всегда оказывается эффективным. Важно выявить цитологические и молекулярно-генетические маркеры, определяющие злокачественность различных глиом, и найти специфичные мишени для лекарственных препаратов. Поэтому мы собираем коллекцию линий глиом, полученных из образцов послеоперационного материала клиники НИИТО за период 2021-2023 годов, чтобы сформировать базу для исследования процессов онкогенеза.

При культивировании необходимо сохранить изначальные характеристики опухоли, в первую очередь наличие раковых стволовых клеток, которые отвечают за жизнеспособность и рост опухоли [1]. Наиболее благоприятные условия для сохранения стволовых клеток в культуре обеспечиваются при культивировании в сфероидах. Поэтому для обеспечения представительности коллекции, мы культивируем линии глиом как в адгезивных условиях (в монослое), так и в неадгезивных (нейросферы). Для полученных линий глиом мы проводим морфологический анализ, цитогенетический анализ с целью выявления крупных хромосомных перестроек и иммуноцитохимический анализ на наличие маркёров стволовых клеток: CD133, CD15, NANOG, NOTCH, SOX2, OLIG2.—Дальнейший анализ мутаций проводится при помощи гибридизации *in situ* с хромосом-специфичными зондами.

Сейчас в нашей коллекции 23 линии глиом, среди которых 12 линий опухолей четвертой стадии. Для 10 линий проведен цитогенетический анализ, для 2 линий – иммуноцитохимический анализ на маркеры стволовых клеток и для 1 линии – гибридизация *in situ*. Среди проанализированных линий мы наблюдали коделецию 1p/19q хромосом, диагностический признак олигодендроглиом [1]. Также встречались линии с потерей Y-хромосомы, дупликацией хромосом 19 и 20, а также с делециями различных масштабов. Линии клеток доступны в ЦКП «Коллекция плюрипотентных культур клеток человека и млекопитающих общебиологического и биомедицинского направления» ИЦиГ СО РАН (<https://ckp.icgen.ru/cells/>; http://www.biores.cytogen.ru/brc_cells/collections/ICG_SB_RAS_CELL). В дальнейшем мы планируем продолжить характеризацию линий и расширение коллекции.

Исследование было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

1. Cairncross G., Jenkins R. Gliomas with 1p/19q codeletion: aka oligodendroglioma //The Cancer Journal. – 2008. – Т. 14. – №. 6. – С. 352-357.

РАЗНЫЕ ЛИНИИ НЕЙРАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ ИПСК, ДЕМОНИСТРИРУЮТ РАЗЛИЧНЫЕ СПЕКТРЫ СПОНТАННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В УСЛОВИЯХ ДЛИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *IN VITRO*

А.А. Галиакберова*^{1,2}, Э.Б. Дашинимаев^{1,3}

¹ Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997

² Биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

³ Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, 141701

* adgaliakberova@gmail.com

Получение нервных стволовых клеток (НСК) и нейронов человека из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), является актуальным направлением современной клеточной биологии не только для изучения нейрогенеза, но также для моделирования различных заболеваний нервной системы и поиска способов их коррекции. Однако разработка оптимальных протоколов получения и длительного культивирования НСК с целью генерации нейронов остается сложной задачей. Одним из наиболее важных аспектов этой проблемы является определение стабильности НСК при их длительном культивировании *in vitro*. Для решения этой проблемы наше исследование было направлено на изучение профиля спонтанной дифференцировки различных культур НСК человека при длительном культивировании, полученных из ИПСК при помощи наиболее популярного протокола с DUAL SMAD ингибированием.

С помощью методов иммуноцитохимии и количественного ПЦР мы показали значительные различия в клеточном спектре гетерогенных нейральных культур, спонтанно дифференцированных из четырех разных линий НСК, полученных от разных доноров. Мы также обнаружили, что на профиль спонтанной дифференцировки НСК влияет длительность их культивирования *in vitro*. Причем различия в нейральных культурах, дифференцированных из НСК, а также их гетерогенность проявляются не просто на общем транскриптомном уровне, но и на уровне представленности различных клеточных популяций, что было продемонстрировано нами при помощи метода секвенирования РНК единичных клеток (scRNA-seq).

Наши результаты показывают, что на стабильность НСК могут влиять как внутренние факторы (генетические и эпигенетические), так и внешние (условия и продолжительность культивирования). Эти результаты имеют важное значение для разработки оптимальных протоколов культивирования НСК и подчеркивают необходимость дальнейшего изучения факторов, влияющих на стабильность этих клеток в условиях *in vitro*.

Данное исследование финансировалось грантом № 075-15-2019-1789 Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, выделенным Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины.

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА RUNX2 И СИГНАЛЬНОГО ПУТИ NOTCH НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК

Е. С. Громова^{1,2*}, Д. А. Костина¹, В. В. Карелкин³, А. Б. Малашичева^{1,2}

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский Государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

³ НМИЦ ТО им. Р.Р. Вредена, Санкт-Петербург, 195427

* kate.gromova01@mail.ru

Runx2 – транскрипционный фактор, который является главным регулятором остеогенной дифференцировки остеобластов. Кроме того, Runx2 является важной сигнальной молекулой и взаимодействует с разными сигнальными путями: Wnt, Bmp, Msx2 и Notch [1]. Кальцификация является важным физиологическим процессом, который происходит как при нормальном развитии, так и при патологии. Runx2 необходим при переходе прогениторных мезенхимных стволовых клеток в преостеобласты, а его активность имеет большее значение на ранних стадиях дифференцировки. Молодые остеобласты продуцируют различные белки, такие как остеокальцин, остеоопонтин, костно-морфогенетические белки BMPs. Так же на уровень белка Runx2 большое влияние оказывает убиквитин-зависимая деградация в протеасоме. Взаимодействие Runx2 и сигнального пути Notch представляет большой интерес для изучения воздействия на дифференцировку остеобластов, так как Notch является высококонсервативным сигнальным каскадом, который участвует в развитии и регенерации клеток костной ткани.

Для изучения взаимодействия Runx2 и Notch при остеогенной дифференцировке были использованы лентивирусные конструкции, несущие внутриклеточные домены Notch и малые РНК, образующие шпильки (*NI,2,3,4ICD*; *shNOTCH1,2,3,4*), конструкции с тремя изоформами гена *RUNX2* (*RUNX2full* – полноразмерный ген, *RUNX2delta* – с укороченной последовательностью, *RUNX2stop* – со стоп-кодоном) и шпилечной РНК *shRUNX2* и *shCSL*, которая препятствует связыванию внутриклеточного домена Notch с ДНК-связывающим доменом и блокирует активацию транскрипции его генов-мишеней. Таким образом экспрессию генов активировали, либо ингибировали посредством лентивирусных конструкций.

Методом ПЦР в реальном времени было установлено, что гиперэкспрессия *NICD1-4*, а также ингибирование пути Notch приводили к снижению активности промотора Runx2 на ранних сроках. Так же с помощью ПЦР и иммуноцитохимического окрашивания показали положительное влияние оверэкспрессии *RUNX2* на продукцию остеомаркеров в ответ на внесение конструкций с изоформами *RUNX2*. Исследование действия на остеодифференцировку протеасомной деградации с помощью ингибитора протеасом MG132 показало, что стабилизация уровня белка положительно влияет на способность клеток к минерализации.

Данные результаты демонстрируют важность стабилизации уровня Runx2 в остеобластах и сложную динамику взаимодействия с сигнальным путём Notch. Данные биологические эффекты требуют дальнейшего изучения.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

1. Rutkovskiy A., Stensløkken K.-O., Vaage I.J. Osteoblast Differentiation at a Glance//Medical Science Monitor Basic Research, 2016, T. 22, C. 95-106.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОТИПА ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА МЕТОДАМИ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ

В.В. Гурский^{1,2,*}, О.А. Краснова¹, А.С. Чабина¹, К.А. Кулакова¹, И.Э. Неганова¹

¹ Институт цитологии, Санкт-Петербург, 194064

² ФТИ им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 194021

gursky@math.ioffe.ru

Способность плюрипотентных стволовых клеток человека к неограниченной пролиферации и самообновлению определяет их широкое применение в области регенеративной медицины. Морфологическая оценка растущих колоний и клеток может быть использована в качестве неинвазивного метода безопасного отбора лучших клонов для дальнейшего клинического применения [1]. С этой целью был проведён анализ морфологических параметров колоний и клеток, извлечённых из фазово-контрастных изображений эмбриональных стволовых клеток человека H9, контрольной линии индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека AD3 и линии индуцированных стволовых клеток NPCASRi002-A (CaSR). С помощью визуального анализа была проведена классификация морфологического фенотипа каждой колонии по потенциалу поддержания плюрипотентности. С помощью метода искусственных нейронных сетей были построены модели классификации колоний и клеток по фенотипу, использующие выбранные морфологические параметры в качестве предикторов. Модели позволяют распознавать фенотип с точностью 70–75%. В результате анализа экспрессии одиннадцати генов-маркеров плюрипотентности были выявлены группоспецифичные наборы генов, которые можно использовать как наиболее информативные для выделения лучших клонов [2]. Используя метод сверточных нейронных сетей, был построен классификатор, различающий с точностью 89% фазово-контрастные изображения колоний эмбриональных стволовых клеток человека с «хорошими» и «плохими» морфологическими фенотипами, связанными соответственно с высоким и низким потенциалом плюрипотентности [3]. Полученные результаты показывают принципиальную возможность построения морфологического портрета колонии, информативного для автоматической идентификации фенотипа, связанного с плюрипотентностью и клональностью.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ, проект № 21–75–20132.

1. Gursky, V., Krasnova, O., Sopova, J., Kovaleva, A., Kulakova, K., Tikhonova, O., Neganova, I., 2023. How Morphology of the Human Pluripotent Stem Cells Determines the Selection of the Best Clone. In: Advances in Pluripotent Stem Cells (Leisheng Zhang ed.), IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.112655>
2. Krasnova, O.A., Gursky, V.V., Chabina, A.S., Kulakova, K.A., Alekseenko, L.L., Panova, A.V., Kiselev, S.L., Neganova, I.E., 2022. Prognostic Analysis of Human Pluripotent Stem Cells Based on Their Morphological Portrait and Expression of Pluripotent Markers. International Journal of Molecular Sciences 23, 12902. <https://doi.org/10.3390/ijms232112902>
3. Mamaeva, A., Krasnova, O., Khvorova, I., Kozlov, K., Gursky, V., Samsonova, M., Tikhonova, O., Neganova, I., 2023. Quality Control of Human Pluripotent Stem Cell Colonies by Computational Image Analysis Using Convolutional Neural Networks. International Journal of Molecular Sciences 24, 140. <https://doi.org/10.3390/ijms24010140>

ВЛИЯНИЕ ФИТИНОВОЙ КИСЛОТЫ НА КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА.

Гурьянов Е.И.¹, Никонов П.О.¹, Нащкина Ю.А.¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург

* murlok2000@mail.ru

Фитиновая кислота или IP6 пропагандируется как противораковое средство в магазинах здоровой пищи. Однако в научной литературе данных по влиянию фитиновой кислоты на клетки очень мало. Фитиновая кислота содержится в бобовых, пшеничных отрубях и соевых продуктах. Считается, что это активный ингредиент, который придает этим веществам способность бороться с раком. Предлагаемые механизмы действия включают изменение генов, усиление иммунитета и антиоксидантные свойства. Также фитиновая кислота является сшивающим агентом для коллагена.

Для определения цитотоксичности фитиновой кислоты на клетки человека использовали метод метилтетразолиевый тест (МТТ). В экспериментах использовали культуру клеток, таких как мезенхимных стромальных клеток (FetMSC), карцинома печени человека (HEP G2), остеосаркома человека (MG 63), остеосаркома человека (HOS), карцинома мочевого пузыря человека (T24), глиобластома человека (T98G). Фитиновую кислоту добавляли в питательную среду через день после посева клеток на плату. Для выявления закономерности влияния концентрации фитиновой кислоты на клетки использовали 4 концентрации: 0.88 мкл/мл, 0.44 мкл/мл, 0.22 мкл/мл, 0.11 мкл/мл, 0.055 мкл/мл. Измерения производили на 3 день после добавления фитиновой кислоты в питательную среду.

В результате измерений выяснили, что культура клеток HEP G2 и HOS наиболее чувствительны к фитиновой кислоте и показали обратную зависимость жизнеспособности клеток относительно концентрации фитиновой кислоты в питательной среде, чем выше концентрация фитиновой кислоты, тем меньший процент клеток относительно контроля остаётся жизнеспособен. Также измерения показали, что FetMSC менее подвержены влиянию фитиновой кислоты, при концентрации 0.88 мкл/мл фитиновой кислоты процент выживания клеток относительно контроля составляет 78%, когда HEP G2 и HOS по 45% и 55% соответственно.

Данные результаты в совокупности с результатами влияния фитиновой кислоты на коллагеновые гели могут служить аргументом для использования фитиновой кислоты в качестве модификации коллагеновых гелей.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (Соглашение No 21-74-20120).

БИОАКТИВНЫЕ ПОКРЫТИЯ НА БИОРЕЗОРБИРУЕМЫЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫЕ СКАФФОЛДЫ ИЗ ПОЛИКАПРОЛАКТОНА

Г.Е. Дубиненко^{1*}, В.С. Бочаров, С.И. ¹, Д.А. Попков², А.В. Попков², Твердохлебов¹

¹ Томский политехнический университет, Томск, Россия

² ФГБУ «НМИЦ ТО имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России, Курган, Россия

* dubinenko@tpu.ru

Разработка новых функциональных материалов для изготовления биорезорбируемых тканеинженерных скаффолдов является актуальной задачей медицинского материаловедения [1]. Одним из широко исследуемых для применения в медицине биорезорбируемых материалов является алифатический полиэфир поликапролактон (ПКЛ) [2]. Однако, ПКЛ, как и большинство биорезорбируемых полимеров, лишен биоактивных свойств, что ограничивает его использование для замещения тканевых дефектов без введения биоактивных добавок. Целью данного исследования являлось применение обработки поверхности скаффолдов из ПКЛ и композиционного материала ПКЛ/гидроксиапатит (ГА) смесью «хороший/плохой» растворитель в качестве метода закрепления на поверхности скаффолдов биоактивных частиц гидроксиапатита (ГА).

В исследовании было показано, что обработка пористых скаффолдов из ПКЛ и ПКЛ/ГА, изготовленных методом FDM 3D печати, смесью растворителей толуол/этанол в объемном соотношении 3/7 позволяет закрепить на внешней и внутренних поверхностях скаффолдов частицы ГА. Массовая доля ГА составляет $5,7 \pm 0,8$ мас.% от общей массы покрытого скаффолда. Методом сканирующей электронной микроскопии было показано, что морфология пористых скаффолдов при воздействии смеси растворителей не нарушается. Методом инфракрасной спектроскопии подтверждена химическая стабильность материала скаффолдов. Влияние покрытия ГА на биологические свойства скаффолдов было оценено в условиях *in vitro* на остеобластах - клетках костной ткани мезенхимного происхождения, играющих важную роль в ремоделировании костей и развитии скелета. Было показано, что скаффолды из ПКЛ и ПКЛ/ГА без покрытия ингибируют остеогенную дифференцировку остеобластов, а скаффолды с покрытием ГА индуцируют остеогенную дифференцировку клеток костной ткани и синтез кальцифицированного внеклеточного матрикса. Влияние покрытия ГА на остеоинтеграцию скаффолдов из ПКЛ было оценено в условиях *in vivo* в эксперименте по замещению сегментарного дефекта длиной трубчатой кости овцы. Было показано, что скаффолд с покрытием ГА способен стимулировать репаративный остеогенез.

Исследования поддержаны Министерством науки и высшего образования, проект Наука FSWW-2023-0007.

1. Cheah C.W. et al. Synthetic Material for Bone, Periodontal, and Dental Tissue Regeneration: Where Are We Now, and Where Are We Heading Next? // *Materials* 2021, Vol. 14, Page 6123. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 14, № 20. P. 6123.
2. Yang X. et al. The Application of Polycaprolactone in Three-Dimensional Printing Scaffolds for Bone Tissue Engineering // *Polymers* 2021, Vol. 13, Page 2754. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. Vol. 13, № 16. P. 2754.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ХОНДРОСФЕР ИЗ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ В ПРОЦЕССЕ ИХ ФОРМИРОВАНИЯ IN VITRO

Б.А. Закопайко^{1,2*}, С.А. Александрова²

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

* bogdanzakopayko@gmail.com

Создание и описание модельной системы хондрогенной дифференцировки, а также культуры органоидов из хондробластов *in vitro* необходимо для различных целей регенеративной медицины. Особенности таких систем является необходимость культивирования клеток в трехмерных условиях в виде сфероидов, так как образование плотных контактов между клетками служит обязательным этапом формирования хрящевой ткани. Целью настоящей работы являлось описание процесса сфероидообразования по морфометрическим показателям.

В исследовании был использован набор диплоидных клеточных линий, полученных авторами самостоятельно или в ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» ИИЦ РАН: мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК) костного мозга человека (взрослого и эмбриона - линия FetMSC), новорожденного кролика (три культуры), хондробласты взрослых людей (две культуры) и кроликов (две культуры). Клетки были декриоконсервированы и размножены при монослойном культивировании на стандартных флаконах для адгезионных культур. Для формирования сфероидов клетки открепляли от поверхности, подсчитывали количество и концентрировали в малом объеме среды. Каплю клеточной суспензии объемом 10 мкл, в которой содержалось 100 тыс. клеток, помещали в центр лунки 96-луночного планшета для получения сфероидов (Nunc clone sphere) и оставляли на 1,5 ч в CO₂-инкубаторе. После этого добавляли в каждую лунку по 200 мкл – или среду для хондрогенной дифференцировки StemPro® Chondrogenesis Differentiation Kit (Gibco) или DMEM/F12 (Gibco) с сывороткой (контроль) и культивировали в течение четырех недель. Для анализа динамики сфероидообразования проводили фотофиксацию каждые семь сут под инвертированным микроскопом Nikon Eclipse TS100. Полученные изображения обрабатывали в программе Image J 1.48, с помощью которой вычисляли основные морфометрические параметры сфероидов – площадь и степень округлости. В программе “Excel” строили графики зависимости параметров от длительности культивирования.

Можно отметить следующую динамику формирования хондросфер. Так, клетки в течение -1,5 ч, пока находились в малом объеме среды, прикреплялись друг к другу. Далее, уже в полном объеме среды в течение первых суток они формировали округлые сфероиды, слабо прикрепленные к поверхности планшета. В течение 2-3 сут такие сфероиды имели максимальные размеры своей площади. При этом степень округлости могла варьировать. В дальнейшем за счет активных процессов установления межклеточных контактов примерно к 10 сут сфероиды обычно компактизовались и приобретали более округлую форму. Степень округлости значительно увеличивалась и сохранялась весь период. Однако площадь большинства сфероидов к 17 сут уменьшалась, и этот процесс продолжался до конца эксперимента. При этом степень уменьшения была гораздо ниже в условиях культивирования в дифференцировочной среде. Кроме того, она была ниже у клеток первичных культур хондроцитов по сравнению с культурами МСК. Сходная динамика отмечалась как для клеток человека, так и кролика. Можно считать выбранные параметры (площадь и степень округлости) подходящими для оценки способности к хондрогенной дифференцировке стволовых клеток, а также анализа жизнеспособности хондросфероидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания FMFU-2021-0008.

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА OCT4, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИХ ГЕТЕРОДИМЕРИЗАЦИЮ SOX2-OCT4 В ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

А.С. Зиновьева^{1,2}, А.Н. Томилин², *Е.И. Бахмет^{2*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

² Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

* - e.bakhmet@incras.ru

Отличительными способностями плюрипотентных стволовых клеток (ПСК) являются самообновление и возможность дифференцироваться во все типы соматических клеток, а также в половые клетки. Одним из ключевых маркеров ПСК является транскрипционный фактор Oct4. Oct4 относится к пятому классу семейства POU-доменных белков (POU5). В ПСК Oct4 выполняет свои функции в комплексе с белком Sox2, представителем SoxB класса. Образование гетеродимера Sox2-Oct4 является обязательным условием индукции плюрипотентности. Важно отметить, что представители других классов POU-доменных белков более склонны к образованию гомодимеров и выполняют свои функции независимо от белков SoxB-класса.

Образование комплекса Sox2-Oct4 обеспечивается консервативными аминокислотами POU-домена Oct4 и HMG-домена Sox. При сравнении аминокислотных последовательностей POU-доменных белков нами было отмечено, что у представителей POU5-класса в зоне контакта с SoxB-белками отличительными аминокислотами являются Лейцин-16, Лизин-19 и Треонин-22 POU-домена (L16, K19, T22), в то время как у других классов POU-доменных белков, как правило, в этих позициях находятся Фенилаланин-16, Аргинин-19 и Лизин-22 (F16, R19, K22). Мы предполагаем, что наличие данных аминокислот может способствовать усилению взаимодействия SoxB-POU5. Современные данные указывают на происхождение белков POU5-класса в ходе дупликации одного из представителей POU3-класса, функции которых связаны с нейрогенезом. Мы предполагаем, что замены аминокислот L16F/K19R/T22K могут привести к диссоциации комплекса Sox2-Oct4, и как следствие, к превращению Oct4 в фактор нейроэктодермальной дифференцировки.

В рамках представленной работы нами были сделаны генетические конструкторы с различными заменами кодонов, кодирующих перечисленные аминокислоты. В настоящий момент мы работаем над проверкой способности мутантных форм Oct4 индуцировать плюрипотентность при репрограммировании эмбриональных фибробластов мыши, а также поддерживать плюрипотентный статус клеток. Вместе с тем мы оцениваем, приобретает ли мутированный Oct4 свойства нейронального фактора.

В фундаментальном аспекте выявление ключевых аминокислот, обеспечивающих взаимодействие Sox2-Oct4 *in vivo*, позволит определить механизмы, которые лежат в основе функционирования ПСК. Кроме того, понимание этих механизмов позволит эффективнее использовать такие клетки в регенеративной медицине.

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-75-10096, <https://rscf.ru/project/23-75-10096/>.

КАТИОННЫЙ ПОЛИМЕР ИЗМЕНЯЕТ АДГЕЗИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ФИБРОБЛАСТОВ

В.П. Иванова*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, 194223 Россия

* valet@iephb.ru

Поиск синтетических поликатионов (ПК), используемых в качестве покрытий для регулирования адгезионной активности клеток, остается важным направлением биотехнологии. Биосовместимость синтетических полимеров связана с клеточным поведением в процессе контакта клеток с этими материалами и чаще всего она определяется клеточной адгезией к полимерным субстратам

В настоящей работе исследовали влияние ПК поли-2-диметиламиноэтилметакрилата (ПДМАЭМ) на адгезию фибробластов линии CHL V-79 RJK. Клетки культивировали в питательной среде без сыворотки с ПДМАЭМ в концентрации от 0.1 до 100 мкг/мл 30 мин при 37°C. После добавления сыворотки клеточную суспензию переносили в планшет и выдерживали 1 ч в тех же условиях. Часть планшетов предварительно обрабатывали ПК в концентрациях 10, 20 и 50 мкг/мл (18 ч при 4°C). В лунки планшета вносили клеточную суспензию в полной питательной среде и выдерживали 1 ч при 37°C. Прикрепившиеся клетки окрашивали кристаллическим фиолетовым.

В результате проведенных нами исследований установлено, что адсорбированный на полистироловой поверхности ПДМАЭМ поддерживает адгезию фибробластов на одном уровне с контрольными значениями вне зависимости от использованной дозы ПК для его адсорбции на пластиковой поверхности. Предварительная обработка фибробластов ПДМАЭМ по-разному влияла на адгезию клеток к необработанному пластику. Если при малых концентрациях ПДМАЭМ практически не влиял на адгезионные свойства клеток, то дальнейшее увеличение его дозы в культуральной среде приводило к дозозависимому ингибированию клеточной адгезии к необработанному пластику.

Известно, что незаряженные фрагменты ПК взаимодействуют с гидрофобными участками мембранных фосфолипидных молекул, а положительно заряженные фрагменты полимера взаимодействуют электростатически с отрицательно заряженными участками липидных молекул. При этом ПК может не только адсорбироваться на поверхности клеточной мембраны, но и инкорпорироваться во внутренний монослой липидного бислоя мембран. Сегрегация фосфолипидов в мембране обуславливает перераспределение плотности поверхностного заряда у клеток, а значит, изменяет силу электростатического взаимодействия между ПК и клеточной поверхностью.

На основании полученных данных можно заключить, что ПДМАЭМ может быть использован в медицинской практике в качестве одного из компонентов многослойных пленок для трансплантации клеток в места повреждения тканей, осуществляя тем самым регулирование процессов клеточной адгезии и восстановление целостности ткани.

Работа выполнена в рамках государственного задания Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН № 075-00967-23-00.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БАРИАТРИЧЕСКОЙ ОПЕРАЦИИ НА ЭКСПРЕССИЮ МИОКАРДИАЛЬНЫХ ГЕНОВ ПРИ ПОСТИНФАРКТНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

Корнюшин О.В.¹, Деркач К.В.², Бахтюков А.А.³, Сонин Д.Л.^{1,3},
Казантаева М.^{1,4}, Шпаков А.О.^{2,5}

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

²ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³ГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

⁴Биологический факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁵Медицинский факультет, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

* mansya01@mail.ru

Бариатрические операции (БО), в том числе продольная резекция желудка (ПРЖ), открывают новые перспективы в лечении различных заболеваний. В основе их терапевтического эффекта лежит как уменьшение количества жировой ткани, так и изменение инкретинового статуса и чувствительности тканей к инсулину и лептину. Имеются данные о положительном влиянии БО на функции сердечно-сосудистой системы, нарушенные при сахарном диабете и метаболическом синдроме. Однако механизмы такого влияния до конца не выяснены. Полагают, что основную роль здесь играет восстанавливающий эффект БО на энергетический обмен и лептиновую и инсулиновую чувствительность. Нельзя исключить прямого воздействия БО на функции миокарда, которое может реализовываться через специфичные механизмы, вовлеченные в регуляцию фундаментальных клеточных механизмов в кардиомиоцитах, фибробластах и эндотелиальных клетках. Имеются данные, что ПРЖ улучшает диастолическую функцию миокарда независимо от потери веса у крыс с моделью ожирения и хронической сердечной недостаточности (ХСН) с сохранённой фракцией выброса с благоприятными изменениями в экспрессии миокардиальных генов, связанных с ХСН, включая кальциевую АТФазу (АТР2А2). Целью работы было изучить влияние ПРЖ на уровни инсулина, лептина, глюкагоноподобного пептида-1 (ГПП-1) и грелина в крови и на экспрессию маркеров миокардиальной дисфункции у крыс с постинфарктной ХСН в сравнении с ложнооперированными (ЛО) животными (постинфарктная ХСН+лапаротомия) и крысами с постинфарктной ХСН без лапаротомии. ПРЖ приводила к нормализации экспрессии генов *Tgrc6* и *Tgfb1*, но не влияла на экспрессию генов *Tgrc3* и *Atp2a2*. Имеются данные, что повышенная экспрессия *TRPC6* ассоциирована с кальций-индуцируемым апоптозом кардиомиоцитов, вызванным инфарктом миокарда, а также вовлечена в процессы гипертрофии левого желудочка при кардиомиопатии. *TGFβ1*, в свою очередь, вовлечен в процессы кардиосклероза и кардиовоспаления в постинфарктный период, причем на ранних стадиях постинфарктного периода он может защищать кардиомиоциты от повреждения провоспалительными цитокинами, в то время как в более отдаленные сроки *TGFβ1* способствует фиброзу и гипертрофии. В ходе работы было показано, что нормализация экспрессии генов *Tgrc6* и *Tgfb1* может быть вовлечена в кардиопротекторный эффект ПРЖ, ослабляющий негативные последствия инфаркта миокарда и, тем самым, предотвращающий запуск *TRPC6*- и *TGFβ1*-опосредуемых каскадов, ассоциированных с постинфарктным кардиосклерозом и кардиовоспалением.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ЦЕЛОСТНОСТЬ ИНДУЦИРОВАННЫХ ЦИТОХАЛАЗИНОМ В МИКРОВЕЗИКУЛ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

С.К. Клетухина*, М.О. Гомзикова

Казанский (Приволжский) Федеральный университет, Казань, 420008, Россия

* sevindzh.rasulova.1993@mail.ru

Введение: Микровезикулы (МВ) - это окруженные мембраной сферические микро- и наноструктуры, которые участвуют в межклеточной коммуникации. На сегодняшний день МВ, полученные из мезенхимных стволовых клеток (МСК), являются многообещающими средствами для терапии различных заболеваний. Обработка клеток цитохалазином В позволяет получать МВ в большом количестве, пригодном для промышленного масштаба. Однако, стабильность МВ в растворе для хранения ранее не изучалась. В связи с этим, целью нашей работы было оценить стабильность МВ, индуцированных цитохалазином В иМВ при различных условиях хранения

Материалы и методы: иМВ получали согласно ранее описанному протоколу. Выделенные иМВ ресуспендировали в физиологическом растворе, распределили по отдельным пробиркам и хранили в различных условиях: 1) при температуре +4 °С 112 дней; 2) при температуре -20°С 111 дней; 3) при температуре 25 °С 28 дней; 4) лиофилизировали и хранили при температуре -20 °С 112 дней. Затем определяли концентрацию белка в растворе для хранения иМВ, используя набор для анализа белка Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoScientific, США).

Начальная концентрация белка в растворе для хранения иМВ на 0-й день составила 28,65 ±12,1 мкг/мл. После суток хранения, концентрация белка в растворе увеличилась до 99,6± 13,6 мкг/мл (хранение в физиологическом растворе при температуре +4°С), 128,5 ±23,2 мкг/мл (хранение в физиологическом растворе при -20 °С), 138,1 ±18,7 мкг/мл (хранение в физиологическом растворе при +25 °С), 199,2±18,4 мкг/мл (лиофилизирование/регидратация). После 112 дней хранения, концентрация белка в растворе увеличилась до 119,7 ±45,2 мкг/мл (физиологический раствор при +4 °С), 87 ±14,7 мкг/мл (физиологический раствор при -20 °С), 176,3±16,8 мкг/мл (лиофилизирование/регидратация).

Вывод: Мы определили, что во время хранения концентрация белка в растворах для хранения, содержащих иМВ, со временем увеличивается из-за постепенной деградации иМВ. Наиболее глубокие изменения концентрации белка наблюдались при хранении иМВ в физиологическом растворе при +25 °С, при этом концентрация белка увеличивалась в 7,8 раза после 28 дней хранения. Аналогично, хранение иМВ в физиологическом растворе при +4 °С также приводило к увеличению концентрации белка в растворе для хранения иМВ в 4,1 раза. Лيوфилизирование/регидратация также повлияла на концентрацию белка в растворе для хранения иМВ, увеличивая концентрацию белка в 6,1 раза в течение периода хранения. Таким образом, наши данные показали, что наиболее эффективным методом хранения иМВ является хранение в физиологическом растворе при -20 °С, поскольку после 112 дней хранения концентрация белка в растворе для хранения иМВ увеличивалась лишь в 3 раза.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Правительства РФ «Привлечение ведущих ученых в вузы России» (грант 075-15-2021-600) и Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОТОКОЛА ДЛЯ ДОКСИЦИКЛИН-ИНДУЦИРУЕМЫХ СИСТЕМ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Козлова А.М.*¹, Моршнева А.В.¹, Гнедина О.О.¹, Иготти М.В.¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

antonina.koz.m@gmail.com

В молекулярно-биологических исследованиях системы контролируемой экспрессии генов являются удобным инструментом, позволяющим изучать функции белков. Одна из наиболее часто применяющихся систем использует в качестве индуктора антибиотик доксициклин (аналог тетрациклина). При этом замечено, что доксициклин в концентрациях, применяемых для исследований *in vitro*, оказывает антипролиферативное воздействие на клетки [1]. Мы исследовали способность доксициклина индуцировать генно-инженерную конструкцию в зависимости от его концентрации и времени воздействия на клетки с целью модификации протоколов работы с *tet*-регулируемыми системами.

Для работы были использованы клетки линии НСТ116 со встроенной индуцируемой конструкцией для экспрессии гена E1A аденовируса человека типа 5 (Ad5). Клетки были культивированы в среде с добавлением доксициклина в возрастающей концентрации (0,1 – 5 мкг/мл) в течение 6, 12, 24 и 48 часов.

Согласно данным, полученным методом иммуноблоттинга, уже спустя 6 ч после начала воздействия доксициклином наблюдается наработка экзогенного белкового продукта. Далее количество производимого белка увеличивается, достигая максимума в точке 24 ч, после чего начинает снижаться, о чём свидетельствуют данные в точке 48 ч культивирования в присутствии доксициклина. Также данные иммуноблоттинга показывают зависимость уровня экспрессии от используемой концентрации индуктора. При снижении концентрации с 2 мкг/мл, используемой в большинстве протоколов, до 0,5 мкг/мл уровень экспрессии не изменяется и уменьшается только при дальнейшем снижении концентрации.

Таким образом, концентрация 0,5 мкг/мл является достаточной для индукции максимально возможного уровня экспрессии при культивации до 24 ч. Для проведения более длительной индукции необходимо обновление доксициклина в питательной среде для поддержания уровня выработки белка интереса. Использование сниженных концентраций доксициклина позволит избежать артефактов, связанных с влиянием доксициклина на клеточный метаболизм и пролиферацию, при проведении экспериментов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-25-20229 и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

1. Ahler E, Sullivan WJ, Cass A, Braas D, York AG, Bensinger SJ, et al. (2013) Doxycycline Alters Metabolism and Proliferation of Human Cell Lines. PLoS ONE 8(5): e64561.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ РЕЦЕЛЛЮЛЯРИЗАЦИИ МАТРИКСА ТОНКОЙ КИШКИ КАК ЭТАП СОЗДАНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ

А.А. Кокорина*, Р.И. Глушаков

ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 194100
ФГБОУ ВО Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, 194044
Arina.alexandrovna.bio@gmail.com

Введение. Ранения, повреждения, приобретенные и врожденные заболевания органов брюшной полости могут приводить к необходимости резекции участка кишечника. В части случаев производят обширную резекцию, что может привести к тяжелым состояниям и летальному исходу. С развитием тканевой инженерии все более осуществимым представляется восполнение утраченной ткани аналогом – неиммуногенным матриксом, засеянным органоспецифичными клетками, то есть тканеинженерной конструкцией. Целью работы являлась разработка методики рециллюляризации бесклеточного матрикса тонкой кишки как этап создания конструкции для пластики кишечника.

Материалы и методы. Тонкую кишку получали от животного-донора (половозрелые беспородные крысы-самцы, n=5). Децеллюляризацию проводили методом перфузии растворами детергентов: 1% Triton X-100, 1% SDS с общей продолжительностью, включая промывку стерильным фосфатно-солевым буфером, 44 часа. Оценка матрикса проводили гистологически. Для рециллюляризации матрикса его помещали в большой сальник крысы-реципиента (n=3) на срок 2 недели. Для этого циркулярный участок матрикса длиной 2 см надевали на стерильный участок урологического катетера Fr20 длиной 1 см, помещали в сальник крысы путем проведения хирургической операции, закрывали им и фиксировали хирургической нитью. Для рециллюляризации матрикса *in vitro* использовали первичную культуру гладкомышечных клеток тонкой кишки крысы на 2-3 пассаже. Участки матрикса помещали в лунки 12-луночного планшета ворсинками вниз, высевали клетки в плотности около 35 тыс. клеток/см². Через 10 и 30 суток проводили гистологическое исследование.

Результаты. Перфузионно-детергентный способ позволяет получить бесклеточный матрикс тонкой кишки, что подтверждается окрашиванием срезов гематоксилином/эозином, а также флуоресцентным ядерным красителем DAPI. Использование организма реципиента в качестве биореактора дало следующий результат: при микроскопировании препаратов визуализировали полнослойную инфильтрацию матрикса клетками фибробластной морфологии, а также умеренную воспалительную реакцию, выражающуюся в наличии лимфоцитов и гранулоцитов, включая эозинофилы. Матрикс при этом сращен с тканью большого сальника, имеются новообразованные кровеносные сосуды. Изначальная микроархитектура ворсинок при этом потеряна. При рециллюляризации *in vitro* через 10 суток визуализировались клетки на поверхности матрикса. Лишь на 30 сутки клетки мигрировали на всю толщину.

Заключение. Критически важным этапом создания тканеинженерной конструкции на основе децеллюляризованной ткани является ее витализация, что возможно выполнить различными методами. Для создания персонифицированной тканеинженерной конструкции тонкой кишки, матрикс должен включать клетки различных дифференцировочных фенотипов, что сложно сделать, используя организм реципиента как биореактор. Рециллюляризация матрикса органоспецифичными клетками в лабораторных условиях представляется возможной, однако требует гораздо больших материальных и временных затрат.

ПОЛИМЕРНЫЕ И КОМПОЗИЦИОННЫЕ МАТЕРИАЛЫ В ТЕХНОЛОГИЯХ МЕХАНИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНЫХ И ТКАНЕВЫХ ПРОЦЕССОВ ВОССТАНОВЛЕНИЯ

К.А. Колбе^{1,2*}, Н.В. Смирнова¹, В.В. Кодолова-Чухонцева^{1,2}, В.Е. Юдин^{1,2}

¹Институт высокомолекулярных соединений РАН

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого

* kkolbe@yandex.ru

Изменения в механической среде, варьирующиеся от жесткости внеклеточного матрикса до физического стресса, такого как растяжение, сжатие и сдвиг, являются критическими сигналами окружающей среды, которые влияют на фенотипическую пластичность, стабильность и механическую память клеток. Патолофизиологические принципы предполагают, что напряжение является одним из основных триггеров повышенного дезорганизованного отложения коллагена во время воспалительной фазы заживления ран, замедляя их регенерацию [1]. Постоянное натяжение утолщающегося рубца является одной из форм механического стимула, который может вызвать аномальную реконструкцию внеклеточного матрикса, приводящую к образованию гипертрофического рубца. Превентивные терапевтические подходы, такие как использование биоактивных раневых покрытий, тейпирующих лент, биомедицинских устройств, шовных нитей, регулирующих механическую среду раны, позволяет предотвратить или уменьшить гипертрофию рубцовой ткани. Биосовместимые и биоактивные полимеры и композиты на их основе, реагирующие на физические стимулы, представляют собой класс материалов, которые опосредуют световую, электрическую или механическую стимуляцию, и, следовательно, обладают значительным потенциалом в качестве идеальной экспериментальной платформы для разработки матриц, передающих изменяющихся пространственно-временные сигналы клеткам. В данном исследовании были синтезированы композитные пленки на основе 4 % водных растворов хитозана (производство Biolog Herpe GmbH, Германия; молекулярная масса 164 кДа; степень деацетилирования 92%). В качестве наполнителя вводили 0.05, 0.5, и 1 % анизотропных частиц гидроксиапатита (ГА), продольный размер которых составляет 70-100 нм, а поперечный 7-9 нм. Для достижения наилучшего эффекта диспергирование проводили не стандартным ультразвуковым методом, а при помощи ротационного смесителя Silverson. Введение наночастиц ГА до 0,5 % приводит к повышению прочности до 125 МПа и, что особенно важно, удлинения при разрыве композиционных пленок до 31%. Это свидетельствует о хорошем диспергировании наполнителя в полимере. При помощи камеры-биореактора LigaGen в жидкой среде, в физиологических условиях pH и температуры были проведены динамические механические испытания образцов материалов. Полученные данные свидетельствуют, что все образцы имеют высокое удлинение при разрыве (90%). Образцы 0.05 % и 0.5 % ГА более устойчивы во времени, у них наилучшая сопротивляемость к растяжению и провисанию, поэтому их можно выбрать для биомедицинского применения. При проведении МТТ теста с использованием культуры дермальных фибробластов человека было показано, что данные образцы нетоксичны, биосовместимы. Микрофотографии роста клеток на поверхности образцов свидетельствуют о том, что они поддерживают типичную морфологию и структуру роста клеток. Полученные образцы будут использованы для биомеханических исследований *in vitro* и *in vivo* для разработки терапевтических стратегий стимуляции регенерации и ограничения гипертрофии рубцовой ткани при лечении ран.

1. Barnes LA, Marshall CD, Leavitt T, et al. Mechanical forces in cutaneous wound healing: emerging therapies to minimize scar formation. *Adv Wound Care* 2018; 7(2): 47–56.

ОЦЕНКА ПОДВИЖНОСТИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ В УСЛОВИЯХ INVITRO

Ю.В. Колесниченко^{1,2*}, Н.М. Юдинцева¹, М.Г. Хотин¹, Д.В. Кригер¹, Н.А. Михайлова¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 194064

² Санкт-Петербургский Государственный Университет, Санкт-Петербург, Россия, 199034

* koles209@mail.ru

Одной из актуальных проблем современной регенеративной медицины является разработка технологий, используемых для восстановления структурной и функциональной целостности поврежденных органов и тканей, в частности кожного покрова. Известно, что в процессе восстановления поврежденной кожи наиболее активное участие принимают дермальные фибробласты (Фб), которые активно мигрируют из неповрежденных областей в рану, где синтезируют и реорганизуют белки внеклеточного матрикса, а также принимают участие в формировании грануляционной ткани. Эффективность использования различных клеточных продуктов напрямую зависит от функционального состояния клеток, входящих в их состав. Одним из критериев оценки функционального состояния клеток является оценка клеточной подвижности.

В данной работе была проанализирована подвижность (скорость и извилистость) дермальных фибробластов человека линии DF3 на восьмом пассаже (Коллекция культур клеток позвоночных ИИЦ РАН). Для оценки подвижности клетки с невысокой концентрацией рассеивали на лунки 6 –луночной платы и культивировали в стандартных условиях. Дополнительно ядра окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Оценку подвижности клеток выполняли в течение 11 часов с помощью автоматического цитометра CQ1 (Yokogawa, Япония), каждые 15 минут регистрируя по 10 полей зрения. Анализ снимков и сбор треков движения производили с помощью программы ImageJ. Данные анализировали с помощью набора программных инструментов в R и с помощью вариационной статистики в GraphPad Prism (GraphPad Software Inc). Для анализа данных использовали непараметрические критерии для выявления значимых различий. Отличия считали достоверным при $p < 0.05$. Для анализа клеточного движения использовали среднеквадратичное отклонение (MSD).

Полученные результаты показали достаточно высокую скорость движения клеток, исследуемых на данном пассаже: максимальная скорость достигала до 68,9 мкм/ч, средняя — 9,9 мкм/ч. Наблюдаемые различия в скорости движения могут свидетельствовать о наличии «случайного блуждания», вероятно связанного с небольшим клеточным пассажем. Результаты анализа MSD показали преимущественно направленное движение клеток, характерное для нормальных не трансформированных клеток. Таким образом, было показано, что на восьмом пассаже данная клеточная линия обладает достаточно быстрым и направленным движением клеток. Полученные данные позволяют предполагать, что при использовании клеток DF3 в клеточных продуктах, направленных на восстановление поврежденной кожи, можно предполагать активную направленную миграцию клеток на раневую поверхность и ее эффективное восстановление. Дальнейшие исследования особенностей миграционных процессов Фб на различных пассажах представляют большой интерес как с точки зрения фундаментальной науки, так и с точки зрения оценки предполагаемой эффективности клеточных продуктов с использованием дермальных Фб.

Исследование выполнено при поддержке Минобрнауки России (Соглашение № 075-15-2020-773).

БЕЛОК КОННЕКСИН-43 В КЛЕТКАХ ПОГРАНИЧНОЙ ШАПОЧКИ ЗАДНЕГО КОРЕШКА СПИННОГО МОЗГА ЭМБРИОНА КРЫСЫ

Е.А. Колос*, В.С. Яковлев, Д.Э. Коржевский

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт
экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197376, Россия

*E-mail: koloselena1984@yandex.ru

Клетки пограничной шапочки (Boundary cap cells, КПШ) происходят из нервного гребня и представляют собой временную мультипотентную популяцию клеток, расположенных в дорсальных зонах входа и вентральных точках выхода спинномозговых нервов. На более поздних стадиях онтогенеза они мигрируют в формирующиеся ганглии задних корешков и дифференцируются в различные подтипы сенсорных нейронов и глии. В экспериментальных исследованиях активно изучается влияние экзогенных КПШ на регенерацию нервных волокон [1, 2]. Высказываются предположения о возможной нейропротекторной роли КПШ для нейронов спинного мозга (СМ) [3]. Предполагаемый высокий потенциал использования этих клеток в терапии поврежденного СМ, спинномозгового ганглия и дорсального корешка подчеркивает актуальность изучения гистогенетических особенностей этих клеток и механизмов их межклеточных коммуникаций при миграции и дифференцировке. Целью настоящего исследования явилось изучение динамики образования межклеточных контактов клетками пограничной шапочки заднего корешка в эмбриогенезе крысы, используя ИГХ-маркер коннексин-43 (Cx43). Работа выполнена на эмбрионах крыс Вистар с 12 по 20 сут. развития (E12-E20, n=24). Материал фиксировали в растворе цинк-этанол-формальдегида. ИГХ-реакцию на Cx43 проводили на парафиновых срезах с применением моноклональных мышинных антител (Santa Cruze Biotechnology, США). Для идентификации КПШ проводили ИГХ-реакцию на глутаминсинтетазу с применением моноклональных мышинных антител (Chemicon, США). Содержащие глутаминсинтетазу КПШ были обнаружены на E14-E20 в непосредственной близости к зоне входа дорсального корешка СМ. Установлено, что на этих сроках большое количество КПШ содержат белок Cx43. Продукт ИГХ-реакции выявляется в виде точечного окрашивания цитоплазмы клеток и точечных структур на цитоплазматической мембране клеток. Однако на ранних сроках эмбрионального развития (E14-E17) единичные клетки КПШ не содержат белок. Присутствие Cx43 в КПШ может быть связано с его канальными функциями, обеспечивающими высвобождение малых сигнальных молекул в области дорсальной переходной зоны СМ. Известно, что Cx43-опосредованные кальциевые волны могут напрямую направлять рост аксонов, что делает возможным участие КПШ в ориентации афферентов чувствительных нейронов. Кроме того, Cx43-иммунопозитивные структуры в КПШ могут выполнять канально-независимые функции, обеспечивающие регуляцию миграции и дифференцировки клеток-предшественников.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-25-10003, <https://rscf.ru/project/23-25-10003/>) и гранта Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 05.05.2023 г. № 23-25-10003.

1. Trolle C., Konig N., Abrahamsson N. et al. 2014. Boundary cap neural crest stem cells homotopically implanted to the injured dorsal root transitional zone give rise to different types of neurons and glia in adult rodents. BMC neuroscience. 15. 60. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-15-60>
2. Trolle C., Ivert P., Hoeber J. et al. 2017. Boundary cap neural crest stem cell transplants contribute Mts1/S100A4-expressing cells in the glial scar. Regenerative medicine. 12(4). 339–351. <https://doi.org/10.2217/rme-2016-0163>
3. Aggarwal T., Hoeber J., Ivert P. et al. 2017. Boundary Cap Neural Crest Stem Cells Promote Survival of Mutant SOD1 Motor Neurons. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 14(3). 773–783. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0505-8>

ОЦЕНКА СРЕДНЕЙ ДЛИНЫ ТЕЛОМЕР В КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МЕТОДОМ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Е.А. Котелевская¹, М.М. Юнусбаева¹, Н.И. Енукашвили^{1,2}, Е.М. Приходько¹

¹ Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, 199106

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

kotelevskaya@pokrovcell.ru

Теломеры – концевые участки хромосом, состоящие из повторяющейся последовательности ДНК TTAGGG в комплексе с белковыми молекулами, которые образуют защитную петлевую структуру. Такое строение позволяет системе репарации отличать концы хромосом от двойных разрывов ДНК. Длина теломерной последовательности в соматических клетках человека составляет от 5 до 15 тыс.п.н. [1]. С каждым циклом деления клетки, в результате недорепликации концов хромосом, теломерная последовательность укорачивается. При критической длине теломерной последовательности в 2 тыс.п.н. возникает нарушение репликации ДНК и запускается апоптоз [2]. Длина теломерной последовательности определяет биологический потенциал организма и связана с сопротивляемостью организма оксидативному стрессу и старением. Существует несколько методов определения длины теломер: методом проточной цитометрии, Саузерн-блоттинга и количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). Метод qPCR считается самым простым в исполнении и наиболее удобным для рутинной работы с большим количеством образцов. Постановка данного метода в каждой лаборатории требует предварительного построения калибровочной кривой по результатам анализа значительного количества образцов для достоверной статистической обработки.

В лаборатории Центра клеточных технологий «Покровский» было проведено исследование длины теломер для 170 образцов периферической крови от доноров различных возрастных групп (0-87 лет) методом qPCR по стандартному протоколу, предложенному Sawthorn с соавт. [3]. Для каждого образца определяли отношение (T/S) количества копий теломерных повторов к числу копий уникального гена *IFNB1* (интерферон бета-1b). Нормирование результатов проводили по значениям длины теломер, полученных для клеточной линии 1301 (АТСС, Великобритания) и образца с ранее установленной методом проточной цитометрии длиной теломер.

По полученным данным, была построена линейная кривая распределения относительной длины теломер в зависимости от возраста пациентов ($R^2 = 0,48$). Диапазон распределения значений для каждой возрастной группы варьирует и составляет в среднем 5 тыс п.н. Мы наблюдаем корреляцию длины теломер с возрастом, однако для повышения статистической мощности метода необходимо увеличить объем выборки доноров разных возрастных групп. Данный метод может быть использован в клинической диагностике для определения соответствия длины теломер и возраста пациента, поскольку патологическое удлинение теломер лимфоцитов может свидетельствовать о воспалительных или опухолевых процессах в организме.

1. Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, et al. Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105: 4807-12.
2. Драпкина О.М., and Шепель Р.Н.. "Длина теломер и атеросклероз" *Российский кардиологический журнал*, no. 9 (137), 2016, pp. 84-89.
3. Sawthorn RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res.* 2009 Feb;37(3):e21. doi: 10.1093/nar/gkn1027. Epub 2009 Jan 7. PMID: 19129229; PMCID: PMC2647324.

РОЛЬ ПОЛИМОРФИЗМОВ В ГЕНЕ БЕТА-2-АДРЕНЕРГИЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА В НАРУШЕНИИ ОСТЕОДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТЕОПОРОЗА.

О.А. Краснова^{1,*}, Ю.В. Сопова¹, К.А. Кулакова¹, А.А. Ковалева¹, Г. Васильева²,
А. С. Жук² и И.Э. Неганова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Институт прикладных компьютерных наук Университета ИТМО, Санкт-Петербург, 191002
o.krasnova@incras.ru

Остеопороз – это заболевание скелета, которое характеризуется снижением массы костной ткани (КТ). В норме КТ подвергается ремоделированию, которое представляет собой сбалансированные процессы резорбции КТ с последующим костным формированием [1]. При остеопорозе этот баланс нарушается: резорбция КТ преобладает над костным формированием. В результате повышается хрупкость костей и возрастает риск переломов при минимальной травме [1]. Важную роль в поддержании гомеостаза КТ играют рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCRs). Известно, что мутации в генах, кодирующих GPCRs, положительно коррелируют с прогрессией остеопороза, однако точные механизмы в настоящий момент малоизучены [1]. В рамках нашего исследования мы изучили взаимосвязь наличия полиморфизмов в гене бета-2-адренергического рецептора (*ADRB2*) у пациентов с остеопорозом и нарушением остеодифференцировки – основного процесса костного формирования.

С помощью технологии секвенирования нового поколения (NGS) мы обнаружили однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене *ADRB2* у пациента, страдающего остеопорозом. Были получены мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из фрагментов бедренной кости контрольного пациента (К-МСК) и пациента с остеопорозом (О-МСК), которые были дифференцированы в остеогенном направлении. Было оценено изменение экспрессии гена *ADRB2* при остеоиндукции с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Для оценки эффективности остеоиндукции были использованы ПЦР в реальном времени, окрашивание на щелочную фосфатазу и кальциевые депозиты ализариновым красным.

Нами были выявлены в гене *ADRB2* ранее неизученные SNP rs33910799 и rs17778257, а также уже описанный в контексте остеопороза rs1042713. О-МСК в остеоиндукционной среде характеризовались значимым усилением экспрессии гена *ADRB2* в сравнении с К-МСК. Одновременно с этим О-МСК продемонстрировали слабый уровень остеогенной дифференцировки по сравнению с К-МСК. Несмотря на усиление экспрессии *RUNX2*, главного транскрипционного фактора остеоиндукции, гены, кодирующие маркеры зрелых остеобластов (*COL1A1*, *BGLAP*, *OGN*, *POSTN*) были слабо экспрессированы. Также, О-МСК характеризовались негативным окрашиванием на щелочную фосфатазу и кальциевые депозиты что согласуется с данными об экспрессии маркеров остеодифференцировки.

Полученные результаты впервые демонстрируют возможное негативное влияние SNP в гене *ADRB2* на процесс остеодифференцировки.

Данная работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2021-1075 от 28/09/2021).

1. Luo J, Sun P, Siwko S, Liu M, Xiao J. The role of GPCRs in bone diseases and dysfunctions. *Bone Res.* 2019;7:19. Published 2019 Jul 8. doi:10.1038/s41413-019-0059-6

ВЛИЯНИЕ СЛОЖНОЙ ГЕТЕРОЗИГОТНОЙ МУТАЦИИ В ГЕНЕ *CaSR* НА ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МСК ЧЕЛОВЕКА.

К. Кулакова^{1*}, О. Краснова¹, К. Гусев¹, Ю. Сопова¹, И. Неганова¹.

¹Институт Цитологии Российской Академии Наук, Тихорецкий проспект. 4, Санкт-Петербург, Россия, 194064.

* st075807@student.spbu.ru

Введение. Кальций-чувствительный рецептор (calcium-sensing receptor, CaSR) относится к подсемейству Глутаматных рецепторов, сопряженных с G-белком (G-protein coupling receptors, GPCRs), и играет ключевую роль в процессе кальциевого гомеостаза костной ткани (КТ). CaSR индуцирует процесс дифференцировки мезенхимных предшественников клеток остеобластического ряда за счет увеличения концентрации ионов Ca²⁺ в местах резорбции КТ. Это, в свою очередь, позволяет сохранять баланс между костеобразованием и резорбцией, что является важным аспектом формирования здоровой кости. В настоящий момент известны мутации (A986S, R990G, Q1011E) гена *CaSR*, связанные с остеопорозом [1] – заболеванием, которое характеризуется снижением минеральной плотности костной ткани и нарушением ее микроархитектуры.

Цель. Целью нашей работы является выяснение роли ранее не изученной, компаунд-гетерозиготной мутации в гене *CaSR*, на эффективность остеогенной дифференцировки мезенхимных стволовых клеток.

Материалы и методы. В работе были использованы методы дифференцировки пациент-специфичных (CaSR) [2] и контрольных (AD3) [3] индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в мезенхимные стволовые клетки (иМСК) с последующей индукцией остеогенной дифференцировки (ОД). Эффективность перехода иПСК в иМСК оценивали с помощью проточной цитометрии. Экспрессию специфических генов-остеомаркеров *RUNX2*, *COL1A1*, *OGN*, *BGLAP* и *POSTN* анализировали на 10-й день ОД методом ПЦР в реальном времени. Окрашивание ализариновым красным проводили на 21-й день ОД для выявления депозитов кальция.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о том, что данная мутация в клетках CaSR-иМСК существенно снижает их способность к ОД. В связи с этим, чтобы определить функциональное состояние рецептора CaSR, оказывающего столь существенное влияние на дифференцировку клеток в остеогенном направлении, был проведен сравнительный анализ клеточных ответов контрольных иМСК и CaSR-иМСК при изменении концентрации ионов кальция во внеклеточной среде. Результаты экспериментов показали, что для клеток CaSR-иМСК по сравнению с контрольными иМСК показатели Ca²⁺-осцилляций в ответ на увеличение ионов Ca²⁺ оказались снижены, выявлено большое количество неосциллирующих клеток, что может предполагать сниженную активность рецептора CaSR в клетках, характеризующихся наличием сложной мутации.

Выводы. Таким образом полученные результаты демонстрируют, что сложная гетерозиготная мутация в гене *CaSR* снижает функциональную активность рецептора CaSR. Вероятно, это является одной из причин неспособности данной клеточной линии дифференцировать в остеогенном направлении.

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта (И.Э. Негановой) Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение №075- 15-2021-1075 от 28.09.2021).

1. Vahe, C et al., 2017. *Orphanet journal of rare diseases*. 12,1 19.
2. Panova A. et al., 2021. *Stem cell research*. 54,102414.
3. Neganova I. et al., 2017. *Scientific Reports*. 3;7:41693.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ NAD В РЕГУЛЯЦИИ ПЛЮРИПОТЕНТНОСТИ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШИ

В.А. Куликова*, М.В Антипова, А.В. Кропотов, Л.В Соловьева, А.А Никифоров
Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064
veronika.a.kulikova@gmail.com

Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) играет ключевую роль в клеточном метаболизме и сигналинге [1]. В последние годы появилось множество свидетельств того, что NAD-зависимые процессы участвуют в регуляции плюрипотентности и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток млекопитающих [2, 3]. Ранее мы показали, что эмбриональные стволовые клетки мыши E14 в плюрипотентном и дифференцированном состоянии имеют одинаковый уровень внутриклеточного NAD [4]. В рамках данной работы мы изучали возможную роль компартментализации NAD в регуляции плюрипотентности и дифференцировки клеток E14. При помощи реал-тайм ПЦР мы установили, что при переходе клеток E14 из плюрипотентного в дифференцированное состояние экспрессия гена *Nmnat1*, кодирующего фермент, отвечающий за синтез NAD из никотинамидмононуклеотида в ядре, остается неизменной, тогда как экспрессия его функционального аналога *Nmnat2*, контролирующего синтез NAD в цитозоле, резко снижается. В дифференцированных клетках также значительно повышалась экспрессия гена *Slc25a51*, кодирующего митохондриальный переносчик, опосредующий импорт NAD из цитозоля в митохондриальный матрикс. Более того, с помощью иммуноблоттинга мы продемонстрировали, что уровень ацетилирования альфа-тубулина по лизину 40 - мишени NAD-зависимой цитозольной деацетилазы белков Sirt2 [5] - в дифференцированных клетках значительно превышает таковой в клетках E14, находящихся в плюрипотентном состоянии. Это может быть связано с тем, что в процессе дифференцировки уровень NAD в цитозоле снижается, что, в свою очередь, приводит к подавлению активности Sirt2. Наши данные свидетельствуют о том, что подавление синтеза NAD в цитозоле и его накопление в митохондриях, можно рассматривать как потенциальный регуляторный механизм при переходе клеток E14 из плюрипотентного состояния в дифференцированное.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-14-00319).

1. Kulikova V.A., Gromyko D.V., Nikiforov A.A. 2018. The regulatory role of NAD in human and animal cells. *Biochemistry*. V. 83 P. 800.
2. Gu W., Gaeta X., Sahakyan A., Chan A.B., Hong C.S., Kim R., Braas D., Plath K., Lowry W.E., Christofk H.R. 2016. Glycolytic metabolism plays a functional role in regulating human pluripotent stem cell state. *Cell Stem Cell*. V. 19. P. 476.
3. Fang Y., Tang S., Li X. 2019. Sirtuins in metabolic and epigenetic regulation of stem cells. *Trends Endocrinol. Metabolism*. V. 30. P. 177.
4. Антипова М.В., Куликова В.А., Соловьева Л.В., Кропотов А.В., Светлова М.П., Якимов А.П., Неринский К.Б., Бахмет Е.И., Никифоров А.А. 2023. Влияние стимуляции и подавления биосинтеза NAD на поддержание плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток мыши. *Цитология*. Т. 65, №3. С. 273.
5. Skoge R.H., Ziegler M. 2016. SIRT2 inactivation reveals a subset of hyperacetylated perinuclear microtubules inaccessible to HDAC6. *J Cell Sci*. 129 (15). P. 2972.

КОЛЛАГЕНОВЫЕ ГЕЛИ, МОДИФИЦИРОВАННЫЕ СШИВАЮЩИМИ АГЕНТАМИ В ЦЕЛЯХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В КАЧЕСТВЕ РАНЕВЫХ ПОКРЫТИЙ

Е.С. Лапина^{1,2*}, Э.И. Александер-Синклер¹

¹ Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251

lapina.es@edu.spbstu.ru

Раневые покрытия (РП) – относительно новый класс изделий медицинского назначения. Один из наиболее перспективных видов РП – тканеинженерные биологические покрытия. Они представляют собой биомедицинский клеточный продукт, состоящий из матрицы, заселенной фибробластами кожи и/или кератиноцитами. Важное место среди материалов для матрицы занимает коллаген. Примером такого раневого покрытия является «Эквивалент Дermalный, ЭД», разработанный в Институте Цитологии РАН.

Однако, подобное покрытие обладает определенными недостатками. Среди них высокая скорость биодegradации, а также высокая адгезия к перевязочным материалам. Один из способов компенсации этих свойств является создание вторичного коллагенового РП, модифицированного сшивающими агентами.

К сожалению, некоторые сшивающие агенты обладают явным цитотоксическим действием, например, глутаровый альдегид [1]. На основе литературных данных [2-4] известно, что некоторые другие соединения успешно сшивают коллагеновые фибриллы и при этом обладают низкой цитотоксичностью.

При создании РП коллагеновый гель после действия сшивающих агентов необходимо отмыть от них. При этом остаточные концентрации этих соединений могут повлиять на цитотоксичность РП. Целью работы было исследовать коллагеновые гели, сшитые рибофлавином, галловой кислотой, 1-Этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC) совместно с N-Гидроксисукцинимидом (NHS) на биосовместимость с культивируемыми клетками.

В качестве растворов для вымывания остаточных концентраций сшивающих агентов были использованы дистиллированная вода и фосфатно-солевой буфер (PBS). Коллагеновые гели после сшивания отмывались в этих растворах в течение 20 минут, 3 часов или 1 суток. Для оценки влияния отмываемых коллагеновых гелей на культивируемые клетки использовали метод модельных сред, или метод вытяжек, которые получали в процессе инкубирования в течение 3 суток отмываемых коллагеновых гелей в питательной среде при температуре 37°C. В качестве тест системы для определения биосовместимости выступали фибробласты дермы человека. Жизнеспособность клеток, культивируемых в течение 2-х сут в модельных средах, оценивали по их морфологии и функциональной активности с использованием фазово-контрастной микроскопии и МТТ-теста. Контролем служили клетки, культивируемые в стандартных условиях.

Выявлено, что остаточные концентрации сшивающих агентов влияют на биосовместимость коллагенового геля. При этом отмывание в PBS способствует лучшему удалению остатков сшивающих агентов по сравнению с водой. Отмывание в течение 20 минут в воде недостаточно для удаления цитотоксического действия. Минимальное время этого процесса – 3 часа.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Gough J.E., Scotchford C.A., Downes S. Cytotoxicity of glutaraldehyde crosslinked collagen/poly(vinyl alcohol) films is by the mechanism of apoptosis//Journal of Biomedical Materials Research, 2002, Vol. 61, No. 1, P. 121-130.

2. Yang C. Enhanced physicochemical properties of collagen by using EDC/NHS-crosslinking//Bulletin of Materials Science, 2012, Vol. 35, No. 5, P. 913-918.

3. Krishnamoorthy G., Selvakumar R., Sastry T.P., Sadulla S., Mandal A.B., Doble M. Experimental and theoretical studies on Gallic acid assisted EDC/NHS initiated crosslinked collagen scaffolds//Materials Science and Engineering: C, 2014, Vol. 43, P. 164-171.

4. Wollensak G., Spoerl E., Seiler T. Riboflavin/ultraviolet-a-induced collagen crosslinking for the treatment of keratoconus//American Journal of Ophthalmology, 2003, Vol. 135, No. 5, P. 620-627.

ВЛИЯНИЕ ГЕНА РЕГУЛЯТОРА ХРОМАТИНА MBD3 НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЯМОГО РЕПРОГРАММИРОВАНИЯ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В НЕЙРАЛЬНЫЕ ПРОГЕНИТОРНЫЕ КЛЕТКИ

Е.Д. Момотюк*^{1,2,3}, Н. Ибрагим^{2,7}, Е.М. Самойлова^{1,4}, В.П. Баклашев^{1,4,5,6},
Э.Б. Дашинамаев^{2,3,7}

¹ Федеральный Центр Мозга и Нейротехнологий ФМБА России, Москва, 117513

² Центр высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997

³ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334

⁴ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119334

⁵ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁶ Научно-исследовательский институт пульмонологии ФМБА России, 115682 Москва, Россия

⁷ Московский физико-технический институт (Государственный университет), Долгопрудный, 141701

* edm95r@rambler.ru

Прямое репрограммирование соматических клеток без перехода через стадию плюрипотентных стволовых клеток, является перспективной стратегией получения клинически значимых типов клеток в масштабах пригодных для регенеративной биомедицины. Непосредственное преобразование одного дифференцированного типа клеток в другой минуя промежуточную стадию плюрипотентности, является более безопасным подходом с точки зрения уменьшения вероятности злокачественного перерождения получаемых культур клеток, что делает актуальной разработку эффективных методов и протоколов прямого репрограммирования. Перспективным типом клеток для клеточно-заместительной терапии нейродегенеративных заболеваний и патологий являются нейральные прогениторные клетки (НПК), способные к дифференцировке в функциональные нейроны. На сегодняшний день опубликовано несколько протоколов прямого репрограммирования различных типов клеток в НПК путем принудительной экспрессии факторов транскрипции нейро-эктодермальной ветки развития с обработкой коктейлем ингибиторов сигнальных путей и факторов роста. Однако воспроизводимость и эффективность конверсии клеток в данных протоколах все еще остаются открытыми вопросами. Одним из перспективных подходов увеличения эффективности репрограммирования является ингибирование активности белков-модуляторов ядерного хроматина, которые поддерживают эпигенетический профиль генома и удерживают клеточную идентичность. Учитывая терапевтические преимущества фибробластов кожи человека в качестве исходных клеток, мы поставили перед собой задачу проанализировать возможность их трансформации в НПК-подобные клетки, при помощи экзогенной сверхэкспрессии трех про-нейрональных транскрипционных фактора *Msi1*, *Ascl1*, *Ngn2* при одновременном CRISPR-опосредованном подавлении действия генов *REST* и *MBD3*. Нами было показано, что ингибирование действия гена *MBD3* достоверно увеличивает эффективность прямого репрограммирования фибробластов кожи человека в НПК, что оценивалось по уровню активации экспрессии генов-маркеров *Nestin*, *Pax6*, *Sox2* и др. Данная работа подтверждает возможность получения НПК из фибробластов кожи человека путем прямого перепрограммирования и предлагает пути ее оптимизации.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА России (НИР «Репрограммирование», НИР «Нейромат»).

ЭКСПРЕССИЯ RIPK3 В КЕЛОИДНОМ РУБЦЕ И НОРМАЛЬНОЙ КОЖЕ ЧЕЛОВЕКА

Е.И. Моргун^{1*}, М.С. Сабиров¹, И.С. Изюмов¹, М.С. Шитова¹, С.А. Шелер¹, О.Л. Черкашина¹,
Е.П. Калабушева¹, Е.А. Воротеяк^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН»¹

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»²

* - lady.morgun2016@yandex.ru

Известно, что протеинкиназа RIPK3 задействована в некроптозе, однако в последнее время появляются данные в пользу её неканонических функций в т.ч. об участии RIPK3 в развитии фиброза почек [1].

Иммуногистохимическое окрашивание келоида человека показало экспрессию RIPK3 в множественных Vimentin+ клетках. В то же время в дерме нормальной кожи RIPK3+ клетки были единичными. Для того чтобы оценить изменения уровня экспрессии гена *Ripk3* в фибробластах в келоидном рубце *in vivo* мы проанализировали доступные данные по секвенированию РНК образцов кожи человека. Были взяты данные массового секвенирования РНК, которые были получены в работе Onoufriadis и соавт., 2018 (GSE113619) чтобы выяснить является ли *Ripk3* дифференциально экспрессируемым геном (ДЭГом) при сравнении здоровой кожи и келоидного рубца [2]. Анализ дифференциальной экспрессии генов показал, что *Ripk3* не является ДЭГом при сравнении между здоровой кожей и келоидного рубца. Низкий уровень экспрессии *Ripk3* в данных массового секвенирования РНК потенциально можно объяснить немногочисленной специфической популяцией клеток, где этот ген активен. Поэтому мы проанализировали данные секвенирования РНК индивидуальных клеток для здоровой кожи и келоидного рубца. Мы взяли образцы здоровой кожи из работы Solé-Boldo и соавт., 2020 (GSE130973) и визуально оценили экспрессию *Ripk3* среди клеток различных типов [3]. В здоровой коже *Ripk3*+ клетки удалось детектировать в крайне незначительном количестве. Данные секвенирования РНК индивидуальных клеток в келоидном рубце были взяты из работы Deng и соавт., 2021 (GSE163973) [4]. Было обнаружено, что *Ripk3*+ клеток достаточно много среди эндотелиальных клеток и фибробластов келоидного рубца. Далее мы интегрировали фибробласты из здоровой кожи и келоидного рубца и выполнили стандартные шаги обработки и анализа данных. Мы получили 4 кластера клеток фибробластов, также как в работе Solé-Boldo и соавт., 2020 и оценили распределение *Ripk3*+ клеток по кластерам. Как уже было показано на наборах данных содержащих все типы клеток кожи, в фибробластах келоидного рубца увеличивается количество *Ripk3*+ клеток. Далее мы провели анализ дифференциальной экспрессии генов между состояниями (норма и келоид). Как и в случае с данными массового секвенирования РНК, *Ripk3* не является ДЭГом в фибробластах между здоровой кожей и келоидным рубцом. Более того, из-за небольшого количества экспрессирующих этот ген клеток, он не учитывается в анализе. Тем не менее, мы обнаружили, что процент *Ripk3*+ клеток среди фибробластов келоидного рубца значительно больше, чем в фибробластах здоровой кожи среди всех полученных кластеров клеток. Разница в количестве *Ripk3*+ фибробластов является статистически значимой. Таким образом, экспрессия гена *Ripk3* в фибробластах келоидного рубца не увеличивается в *Ripk3*+ клетках и соответствует определенному физиологическому уровню, как и в фибробластах из здоровой кожи. При этом, значительно (более чем в 10 раз) увеличивается число клеток, которые экспрессируют ген *Ripk3*, что может быть связано с переходом фибробластов в активированное состояние.

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1063 от 28.09.2021.

1. Imamura M., Moon J.S., Chung K.P., Nakahira K., Muthukumar T., Shingarev R., Ryter S.W., Choi A.M., Choi M.E. // JCI insight. 2018. V. 3. № 3.
2. Onoufriadis A., Hsu C.K., Ainali C., Ung C.Y., Rashidghamat E., Yang H.S., Huang H.Y., Niazi U., Tziotzios C., Yang J.C., et al. // The Journal of investigative dermatology. 2018. V. 138. №. 12. P. 2690-2693.
3. Solé-Boldo L., Raddatz G., Schütz S., Mallm J.P., Rippe K., Lonsdorf A.S., Rodríguez-Paredes M., Lyko F. // Communications biology. 2020. V. 3. №. 1. P. 188.
4. Deng C.C., Hu Y.F., Zhu D.H., Cheng Q., Gu J.J., Feng Q.L., Zhang L.X., Xu Y.P., Wang D., Rong Z., et al. // Nature communications. 2021. V. 12. №. 1. P. 3709.

ВЛИЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НОРМАЛЬНЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В.О. Морева^{1,2*}, Н.Б. Бильдюг¹, Э.И. Александер-Синклер¹

¹ Институт Цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

* 00htlf00@gmail.com

Рост клеток эндотелия необходим для поддержания нормального ангиогенеза. Многие патологические процессы приводят к нарушению функций эндотелиоцитов и, как следствие, изменению ангиогенеза. В частности, при опухолевом росте наблюдается эндотелиально-мезенхимный переход (EndMT) – процесс, при котором эндотелиальные клетки теряют часть своих клеточных особенностей и приобретают определенные характеристики мезенхимных клеток, включая снижение количества межклеточных контактов, повышенную миграционную способность и синтез белков внеклеточного матрикса (ВКМ) [1]. EndMT характеризуется перестройкой актинового цитоскелета и появлением в эндотелиоцитах маркеров мезенхимных и гладкомышечных клеток, в частности, гладкомышечного альфа-актина (α -SMA) [2].

Известно, что опухолевый рост клеток в различных органах и тканях сопровождается существенными изменениями ВКМ. В то же время показано, что ВКМ может оказывать влияние на цитоскелет и миграцию различных типов клеток. В связи с этим настоящая работа направлена на изучение роли ВКМ в регуляции ангиогенеза и эндотелиально-мезенхимного перехода. В задачи работы входила оценка морфофункциональных характеристик нормальных и трансформированных эндотелиоцитов при их культивировании на различных матрицах, включающих белки ВКМ.

Нормальные клетки эндотелия (линия HUVEC) и трансформированные эндотелиоциты (линии HUVEC56 и ECV304), полученные из пупочной вены человека, культивировали на матрицах на основе коллагена, желатина и матригеля в течение трех суток и проводили оценку морфологии и выживаемости клеток, а также выявляли организацию цитоскелета и маркер эндотелиально-мезенхимного перехода α -SMA. Результаты анализа показали влияние используемых матриц на морфофункциональные характеристики клеток, при этом, в отличие от матригеля, культивирование как нормальных, так и трансформированных эндотелиоцитов на коллагене и желатине не приводило к формированию капиллярноподобных структур. Также с помощью методов иммунофлюоресценции и Вестерн-блоттинга было показано, что организация цитоскелета клеток зависела от типа используемых матриц, при этом культивирование эндотелиоцитов на желатине приводило к повышению уровня α -SMA.

Полученные данные указывают на значительное влияние ВКМ на морфофункциональные свойства клеток эндотелия *in vitro* и позволяют предполагать, что ВКМ может вносить существенный вклад в регуляцию ангиогенеза *in vivo*.

1. Hong L, Du X, Li W, Mao Y, Sun L, Li X. EndMT: A promising and controversial field. *European Journal of Cell Biology*, 97:493-500 (2018).
2. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 5 Suppl 1:S7 (2012).

ВЛИЯНИЕ ОПРЕДЕЛЕННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ НА ПРОЛИФЕРАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ СУБСТРАТАХ

Н.А. Надеждина*, М.В. Покровский, С.В. Надеждин

ОФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, 308015

*nadezhdina.nat@yandex.ru

Учитывая потенциал регенеративной медицины, терапевтическое использование мезенхимных стволовых клеток (МСК) в последнее время становится многообещающей стратегией для лечения дегенеративных заболеваний. Однако для использования МСК в терапии необходимо дальнейшее понимание и контроль их поведения. В связи с этим поиск новых стимулов, активирующих МСК остается актуальной задачей.

Цель исследования – установить влияние рекомбинантных белков: Еро, FGF2, IGF-I на пролиферацию мезенхимных стволовых клеток при культивировании на различных субстратах.

Исследование выполнено на МСК человека, выделенных из жировой ткани (ООО «БиолоТ», РФ). МСК культивировали в питательной среде DMEM/F12 (ООО «БиолоТ», РФ) с 10% эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и антибиотиками в CO₂ инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. Одну часть МСК культивировали на дне лунок 96-луночного планшета (SPL Lifesciences, Корея) в течении 3 дней. Другую часть МСК культивировали в течении 21 дня на коллагеновой матрице, вырезанной из деминерализованной губчатой пластины (АО «ОЭЗ «ВладМиВа», РФ). На начальном этапе исследования в лунки 96-луночного планшета добавляли питательную среду, которая для 1 опытной группы содержала добавку – эритропоэтин человека – Еро. Для 2 опытной группы композиция рекомбинантных белков: эритропоэтин, фактор роста фибробластов человека-2 - FGF2, и инсулиноподобный фактор роста человека - IGF-I (ООО «СайСторЛаб» РФ). Контролем явилась питательная среда без добавления рекомбинантных белков. Индекс пролиферативной активности (ПАинд., в %) МСК оценивали на 3 и 21 день с использованием реагента МТТ (Sigma-Aldrich, США) и фотометра (Multiskan FC, Thermo Scientific, США). Формула расчета: ПАинд. = $\frac{ОП_0}{ОП_к} \times 100\%$, где ОП – оптическая плотность; э – опытная группа; к – контрольная группа. Оценку миграции МСК в матрицу материала проводили при помощи реагента Calcein, AM (Thermo Fisher Scientific, США) и конфокального микроскопа DIGITAL ECLIPSE C1 plus (Nikon, Япония). Полученные результаты обрабатывали с помощью ПО Statistica 10.0.

В ходе анализа значений оптической плотности полученных при фотометрии были установлены достоверные различия у 1 группы – 0,077 у.е. и 2 группы – 0,092 у.е. по сравнению с контролем – 0,047 у.е., при $p \leq 0,05$. Расчетный индекс пролиферативной активности МСК на 3 день был наибольшим во 2 группе, где составил 195,74%, тогда как в 1 группе он был равен 163,83%. Наряду с этим пролиферативная активность МСК на 21 день культивирования была также больше во 2 группе и составила 165,94%, тогда как в 1 группе равнялась 128,26%. Значения миграционной активности МСК совпадает с результатами пролиферативной активности. Так во 2 группе распространение МСК по матрице проходило в 2 раза интенсивнее чем в 1 группе. В ходе сканирования трехмерной матрицы по осям X, Y, Z и построением трехмерных моделей было установлено, что миграция клеток во 2 группе отмечается на глубину 500 мкм, тогда как в 1 группе 250 мкм и в контрольной группе 125 мкм.

Таким образом, композиция рекомбинантных белков Еро, FGF2 и IGF-I оказывает стимулирующее влияние на пролиферацию и миграцию МСК независимо от субстрата в большей степени, чем только один рекомбинантный белок Еро добавленный в питательную среду.

МЕТИЛТРАНСФЕРАЗА SET7/9 КАК РЕГУЛЯТОР МАРКЕРОВ СТВОЛОВОСТИ В КЛЕТКАХ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Наминат Е.Д., Фролова К.А., Барлев Н.А., Дакс А.А.*

Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4
Санкт-Петербург 194064

*alexandra.daks@gmail.com

Метилирование гистонов по остаткам лизина играет важную роль в глобальной регуляции транскрипции. В зависимости от местоположения лизина-мишени в структуре гистонического белка эта посттрансляционная модификация может либо стимулировать, либо подавлять транскрипцию, влияя на архитектуру хроматина. Кроме того, метилирование лизина, конкурируя с другими специфичными для лизина модификациями (например, ацетилированием, убиквитинилированием и сумоилированием), может влиять на стабильность белка и, следовательно, на его функционирование [1]. Set7/9 (альтернативное название SETD7) представляет собой SET-домен содержащий белок, ((Su(var)-3-9, Enhancer-of-Zeste, Trithorax), который метилирует как гистоновые, так и негистоновые белки. Первоначально было показано, что Set7/9 специфически монометирует лизин 4 гистона 3 (H3K4me1), что способствует активации транскрипции [2].

Например, Set7/9-опосредованное метилирование гистона H3 по лизину 4 усиливает транскрипционную активность генов миогенной дифференцировки (MYOD, MYOGENIN, MHC, MCK), провоспалительного гена RelA/NFκB, синтазы оксида азота (NOS2), SREK1P1 и PGC. Позже было показано, что помимо гистона H3 Set7/9 метилирует гистоны H2A, H2B и H1.4. Список негистоновых субстратов Set7/9 включает опухолевый супрессор p53, альфа-рецептор эстрогена (ER-α), PCAF (P300/CBP-ассоциированный фактор, RelA (NFκB), β-катенин, E2F1 и другие. Метилируя эти субстраты, Set7/9 регулирует их активность, стабильность и внутриклеточную локализацию [3].

В рамках данной работы мы исследовали влияние Set7/9 на экспрессию маркеров раковых стволовых клеток (РСК) на *in vitro* моделях рака молочной железы HER2-позитивного и трижды негативного субтипов со стабильным нокдауном Set7/9.

Так, мы показали, что при подавлении Set7/9 снижается экспрессия таких маркеров, характерных для РСК РМЖ, как CD44, CD133, EpCam, Nanog и Oct4A.

Важно отметить, что уровень экспрессии данных маркеров в клетках РМЖ не только определяет формирование популяции РСК, но также может влиять на такие параметры, как прогноз исхода заболевания и ответ пациента на противораковую терапию.

Согласно полученным нами ранее данным, метилтрансфераза Set7/9 играет важную роль в формировании резистентности клеток РМЖ к различным типам терапии, а также влияет на такие характеристики, как скорость пролиферации и миграционную активность клеток РМЖ. Мы полагаем, что роль Set7/9 в этих процессах может быть частично обусловлена способностью данной метилтрансферазы регулировать уровень маркеров стволовости.

Работа поддержана грантом РФФИ №19-75-10059.

1. Morgunkova A., Barlev N. A. Lysine methylation goes global //Cell cycle. – 2006. – Т. 5. – №. 12. – С. 1308-1312.
2. Nishioka K. et al. PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin //Molecular cell. – 2002. – Т. 9. – №. 6. – С. 1201-1213.
3. Daks A. et al. The role of lysine methyltransferase SET7/9 in proliferation and cell stress response //Life. – 2022. – Т. 12. – №. 3. – С. 362.

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ HSP70 НА СКОРОСТЬ ДВИЖЕНИЯ КЛЕТОК ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МУЛЬТИФОРМНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА НА РАЗЛИЧНЫХ МАТРИКСАХ

Е.А. Оганесян^{1,2*}, Н.М. Юдинцева^{1,2}, Д.Е. Бобков^{1,2}, Р.Б. Тагаева^{1,2}, М.А. Шевцов^{1,2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 194064

² Центр персонализированной медицины, Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия, 197341
praskovya_p@mail.ru

Клеточная подвижность играет важную роль во многих физиологических процессах (заживление ран, иммунный ответ), а также в прогрессировании рака [1]. Разработка новых стратегий ингибирования инвазии клеток мультиформной глиобластомы (МГБ) решающим образом зависит от понимания особенностей движения опухолевых клеток. Предполагается, что клетки с высокой экспрессией мембранно-ассоциированной формы белка теплового шока 70 (mHsp70) обладают высокой подвижностью. В связи с тем, что повышенная экспрессия mHsp70 коррелирует с неблагоприятным прогнозом при многих видах рака, обеспечивает преимущество данных клеток в выживаемости, устойчивость к химиотерапии и высокую инвазивность [2], необходим поиск новых стратегий ингибирования данных процессов.

В настоящем исследовании была выполнена оценка скорости движения клеток первичной культуры МГБ на различных матриксах (Poly-L-Lysine, Matrigel, Fibronectin) под влиянием ингибиторов Hsp70: PES, связывающийся с субстратсвязывающим доменом (SBD) и JG-98, взаимодействующий с нуклеотидсвязывающим доменом (NBD). Клетки были выделены в соответствии со стандартным протоколом из послеоперационного материала, полученного от пациентов (n=5) с диагнозом первичной МГБ [3]. Для создания адгезивной поверхности лунки покрывали различными белками. Суспензию клеток вносили в невысокой концентрации и инкубировали в течение 24 часов. Ингибиторы PES и JG-98 вносили в концентрации 1 мкМ и 50 нМ, соответственно. В качестве контроля использовали клетки без воздействия ингибиторов. Дополнительно ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Эксперимент проводили с помощью автоматической системы визуализации клеток Image ExFluorer (LCI, Корея). Съёмку полей зрения (n=5) производили однократно каждые 15 минут в течение 24 часов. Статистический анализ выполняли при использовании программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., США).

Полученные результаты показали, что скорость движения клеток снижалась на всех типах матриксов при воздействии обоих типов ингибиторов, однако наиболее существенное влияние оказал JG-98, что может свидетельствовать о влиянии N-домена mHsp70 на скорость миграции клеток. Таким образом, полученные данные предполагают перспективность использования данных ингибиторов Hsp70 для снижения инвазивных свойств клеток злокачественных опухолей головного мозга.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2022-301 от 20.04.2022).

1. Mierke C.T. The matrix environmental and cell mechanical properties regulate cell migration and contribute to the invasive phenotype of cancer cells. *Rep Prog Phys.* 2019;82(6):064602. doi:10.1088/1361-6633/ab1628;
2. Juhasz K., Lipp A-M, Nimmervoll B, Sonnleitner A, Hesse J, Haselgruebler T, Balogi Z. The Complex Function of Hsp70 in Metastatic Cancer. *Cancers.* 2014; 6(1):42-66. <https://doi.org/10.3390/cancers6010042>;
3. Seidel S., Garvalov B. K., & Acker T. (2015). Isolation and culture of primary glioblastoma cells from human tumor specimens. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 1235*, 263–275. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1785-3_19.

АНАЛИЗ РАЗЛИЧНЫХ ПОДХОДОВ ПО ПОЛУЧЕНИЮ АДРЕНОКОРТИКОПОДОБНЫХ КЛЕТОК ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Н.А. Онянов*, О.В. Глазова, П.Ю. Волчков

Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), г. Москва, 117303

* onyanov.na@phystech.edu

Надпочечник человека – эндокринный орган, имеющий гетерогенную клеточную и сложную пространственную организации. Он состоит из медулы и коры, которая в свою очередь состоит из 4 зоны: капсулы, клубочковой зоны (КЗ), пучковой зоны (ПЗ) и сетчатой зоны (СЗ) [1]. Эмбриогенез надпочечника развивается через две стадии: фетальную и дефинитивную. После формирования адреногонадного зачатка популяции-предшественники надпочечников и гонад разделяются, клетки зачатка надпочечника начинают обильно экспрессировать SF1 (steroidogenic factor 1). Далее мезенхимальные клетки, из которых разовьется кора, инкапсулируют образующийся надпочечник плода. На этом этапе в части клеток подавляется экспрессия SF1 и начинается экспрессия транскрипционного фактора Glil, а в других - стартует экспрессия 17 α -гидроксилазы. Так заканчивается формирование фетальной коры. Далее она заменяется дефинитивной за счет дифференцировки клеток капсулы [2]. В соответствии с текущей моделью гомеостаза надпочечника в капсуле существуют популяции стволовых клеток, обеспечивающие процесс самообновления органа, которое происходит как путем последовательной трансдифференцировки из клеток КЗ в клетки ПЗ, так и в каждый тип клеток отдельно [3].

Понимание вышеупомянутых процессов дает возможность создавать клеточные и органоидные модели надпочечников. Известно, что экзогенная экспрессия SF1 в МСК приводит к их дифференцировке в стероидогенные клетки, способные формировать трёхмерные структуры [4]. Нами было решено разработать протокол получения адренокортикоподобных клеток на разных этапах дифференцировки из эмбриональных плюрипотентных стволовых клеток (ЭПСК) человека, а также создать репортерную линию SF1-GFP ЭПСК человека. Были получены три протокола, позволяющие с различной эффективностью и себестоимостью получить МСК. Были опробованы три метода получения адренокортикоподобных клеток путем лентивирусной трансдукции кДНК SF1 в ЭПСК и МСК, а также методом CRISPR-Активации гена SF1 в МСК. Также была отработана методика интеграции GFP под промотор SF1 на клеточной линии НЕК293Т.

Финансирование: Соглашение о предоставлении субсидии из федерального бюджета на финансовое обеспечение выполнения государственного задания на оказание государственных услуг №075-01645-22-06, проект № 720000F.99.1.B385AV67000

1. Глазова О.В., и др, Генная и клеточная терапия функциональных патологий надпочечников: достижения и перспективы // Проблемы эндокринологии. — 2021. — Т.67. — №6. — С. 80-89. doi: <https://doi.org/10.14341/probl12818>
2. Kim JH, Choi MH. Embryonic Development and Adult Regeneration of the Adrenal Gland. *Endocrinol Metab (Seoul)*. 2020 Dec;35(4):765-773. doi: 10.3803/EnM.2020.403. Epub 2020 Dec 23. PMID: 33397037; PMCID: PMC7803617.
3. Kim AC, Hammer GD. Adrenocortical cells with stem/progenitor cell properties: recent advances. *Mol Cell Endocrinol*. 2007 Feb;265-266:10-6. doi: 10.1016/j.mce.2006.12.028. Epub 2007 Jan 19. PMID: 17240045; PMCID: PMC1865516
4. Aoyagi C, et all., Differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells into steroidogenic cells by adenovirus-mediated overexpression of NR5A1 and implantation into adrenal insufficient mice. *Cytherapy*. 2023 Aug;25(8):866-876. doi: 10.1016/j.jcyt.2023.04.002. Epub 2023 May 5. PMID: 37149799.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В 3D-УСЛОВИЯХ

Е.Н. Осяева^{1,2*}, Э.И. Александер-Синклер¹

¹ Институт Цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, 194064

² Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034

katya.neiro@gmail.com

Кожа является сложной структурой, функции которой связаны с поддержанием внутреннего баланса и защитой от факторов внешней среды. В процессе заживления кожной раны могут возникнуть осложнения, в следствии которых на месте острой раны может возникнуть хроническая. Главной причиной такого перехода служит удлиненная фаза воспаления, в ходе которой генерируется большое количество перекиси водорода (H_2O_2) и воспалительных медиаторов, которые инициируют скопление иммунных клеток в области раны. В низких, наномолярных, концентрациях H_2O_2 выполняет роль сигнальной молекулы, однако ее избыточное накопление индуцирует в клетках окислительный стресс, что в свою очередь приводит к повреждению биологических молекул. Проблема устойчивости к окислительному стрессу клеток кожи, принимающих участие в ранозаживлении, является актуальной. Большинство *in vitro* исследований по действию окислительного стресса было выполнено на клеточных культурах в условиях 2D культивирования методом проточной цитометрии.

Мы исследовали реакцию клеток на окислительный стресс в условиях как 2D, так и 3D культивирования. В качестве тест-систем использовали дермальные фибробласты (ДФ) и «Эквивалент дермальный ЭД», разработанный в Институте цитологии РАН. Эквивалент представляет собой гидрогель на основе коллагена I типа, в который включены ДФ. Многочисленные клинические исследования показали его высокую эффективность для заживления кожных ран. Влияние внешнего H_2O_2 -индуцированного стресса на жизнеспособность клеток в 2D условиях оценивали путем цитометрического анализа количества клеток, выживших через 24 часа после действия H_2O_2 . Кроме того, в 2D и 3D условиях жизнеспособность клеток оценивали по их морфологии и метаболической активности методами световой микроскопии и МТТ-теста. Окислительный стресс моделировали действием H_2O_2 в диапазоне концентраций 50 – 800 мкМ, добавляя ее в ростовую среду в пересчете на одну клетку (пмоль/кл.) [1]. По данным цитометрического анализа в контроле ДФ за 24 часа проходят S фазу, о чем свидетельствует увеличение G0/G1 фазы. Минимальная доза H_2O_2 вызывает торможение клеток в поздней S/G2M фазе, но часть клеток все-таки проходят в G1 фазу. При повышении дозы H_2O_2 клетки перестают поступать в фазу G1: они находятся в стабильном блоке, обусловленном повреждением ДНК. В контроле в условиях 2D ДФ имеют мезенхимо-подобный фенотип и формируют субконфлюэнтный монослой, в условиях 3D ДФ имеют звездчатую форму и распределены по всему объему геля. В присутствии H_2O_2 в концентрациях 400 – 800 мкМ в 2D наблюдается деструкция монослоя: клетки компактизируются и истончаются, открепляются от поверхности; в 3D – округляются. Результаты МТТ-теста сопоставимы с данными цитометрического анализа и свидетельствуют о цитотоксичности H_2O_2 в высоких концентрациях.

1. Е.Б. Бурова, О.Г. Люблинская, А.Н. Шатрова, А.В. Бородкина, Н.Н. Никольский. Сравнительный анализ устойчивости к окислительному стрессу стволовых клеток эндометрия и фибробластов человека. Цитология. 2012. Vol. 54 (6). P. 478–483.

ИССЛЕДОВАНИЕ RUNX2 КАК АГЕНТА ФИБРОТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Д. Д. Паншин^{1*}, А. А. Мурылева¹, Б. В. Сигуа², Е. Г. Тимофеева², А. Б. Малашичева¹

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

²ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова МЗ РФ

* dany.panshin@yandex.ru

Тенденция увеличения заболеваемости фиброзом является серьезной проблемой современности. Фибротические изменения могут быть индуцированы множеством внешних факторов и затрагивать различные органы и ткани. Наиболее распространены фиброз легких, печени, сердца и почек [1]. Транскрипционные факторы семейства RUNX, играют решающую роль в развитии организма. Существуют доказательства, что транскрипционный фактор RUNX2 также взаимодействуют с профибротическими путями TGF- β , BMP и WNT [2], тем самым оказывая влияние на развитие фибробластов. В то же время существуют данные о том, что подавление RUNX2 может индуцировать процессы обратные фиброзу.

Цель исследования: оценить влияние инактивации и гиперэкспрессии RUNX2 в различных культурах фибробластов человека на основные профибротические маркеры.

В работе были использованы первичные культуры фибробластов человека, выделенных из легких, сердца, двенадцатиперстной кишки (ДК), желчного пузыря (ЖП) и простаты, а также эпителиальная культура HUVEC, в качестве контроля. Гиперэкспрессия RUNX2 запускалась по средствам лентивирусной трансдукции, инактивация производилась при помощи лентивирусов несущих шпилечную конструкцию *shRUNX2*. Методом RT-PCR оценивали экспрессию основных профибротических маркеров: *ACTA2*, *COL1A1*, *SLUG*, *SNAIL*, *SOX9*, *TWIST*.

Уровень экспрессии *ACTA2* достоверно возрастал при гиперэкспрессии RUNX2 в клетках ЖП и сердца. Уровень *SLUG* достоверно снижался при добавлении плазмиды *shRUNX2* в фибробластах простаты и повышался в культуре HUVEC при активации RUNX2. Уровень *SNAIL* достоверно повышался при гиперэкспрессии RUNX2 в фибробластах легких. При добавлении конструкции *shRUNX2* было отмечено достоверное снижение уровня *SOX9* в клетках ЖП, простаты и легких и увеличение экспрессии *SOX9* в этих же клетках и в HUVEC при активации RUNX2.

Механизмы фиброза регулируются множеством факторов и могут различаться в разных тканях. Мы обнаружили изменение уровней ключевых маркеров фиброза в некоторых тканях в ответ на изменение уровня гена RUNX2. Это говорит о том, что RUNX2 может оказывать влияние на фиброгенез, и это требует дальнейшего изучения.

Исследование поддержано грантом научной школы Министерства науки и высшего образования РФ № НШ-4664.2022.1.4.

1. Manyu Zhao et al. Targeting fibrosis: mechanisms and clinical trials. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2022; 7:206

2. Carlo Mumler et al. Cell-specific expression of runt-related transcription factor 2 contributes to pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 32, 2018; 703–716.

ИЗУЧЕНИЕ РЕАКЦИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК ЭНДОНЕВРИЯ СЕДАЛИЩНОГО НЕРВА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ И ВВЕДЕНИЯ МСК

Е.С. Петрова*, Е.А. Колос

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, 197022

*iempes@yandex.ru

В экспериментальных исследованиях многими авторами показано, что применение мезенхимных стволовых клеток (МСК) может способствовать регенерации нерва после механической травмы [1, 2]. Вопрос о влиянии экзогенных МСК на репаративные процессы, происходящие в нервном стволе в ранние сроки после травмы, мало изучен. Реакция клеток эндоневрия в ранние сроки после применения клеточной терапии описана лишь в единичных работах [3]. В настоящем исследовании мы использовали субперинеуральную аллотрансплантацию МСК костного мозга крыс в качестве модели для изучения реакции воспалительных клеток эндоневрия в ответ на повреждение. Цель настоящей работы - исследование распределения популяции макрофагов, тучных клеток и нейтрофилов в седалищном нерве крысы после травмы и однократной трансплантации МСК. Работа выполнена на крысах линии Вистар-Киото массой 200-250 г ($n = 15$). Нерв повреждали путем лигирования в течение 40 с. Части животных субперинеурально вводили суспензию МСК костного мозга крыс Вистар-Киото (5×10^4 клеток в 5 мкл). Через 7 сут после операции для идентификации макрофагов на парафиновых срезах через нерв проводили иммуногистохимическую реакцию на белок Iba-1. Использовали поликлональные козы антитела к антигену Iba-1 (AbCam, Великобритания). Для выявления тучных клеток и нейтрофилов применяли окраску толуидиновым синим и азур-эозином. Сравнительное исследование площади, занимаемой Iba-1-иммунореактивными клетками в группе крыс с лигатурой и в группе крыс, которым после наложения лигатуры трансплантировали МСК, показало, что однократное введение суспензии МСК через 7 сут после операции приводит к снижению количества Iba-1⁺ макрофагов в дистальном сегменте нерва почти в 1,5 раза ($p < 0,05$). Установлено также снижение числа тучных клеток и нейтрофилов на единицу площади нерва в его дистальном сегменте в ранние сроки после операции. Таким образом, показано, что плотность распределения воспалительных клеток (макрофагов, тучных клеток, нейтрофилов) в ранние сроки после применения клеточной терапии снижается, что предположительно связано с выработкой экзогенными МСК противовоспалительных факторов. Отмеченный факт может приводить к изменению (или нарушению) процессов валлеровской дегенерации и последующей регенерации нерва.

1. Siemionow M, Strojny MM, Kozłowska K, Brodowska S, Grau-Kazmierczak W, Cwykiel J. Application of human epineural conduit supported with human mesenchymal stem cells as a novel therapy for enhancement of nerve gap regeneration. *Stem Cell Rev Rep*. 2022. 18(2): 642-659. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10301-z>.
2. Lavorato A, Raimondo S, Boido M, Muratori L, Durante G, Cofano F, Vincitorio F, Petrone S, Titolo P, Tartara F, Vercelli A, Garbossa D. Mesenchymal stem cell treatment perspectives in peripheral nerve regeneration: systematic review. *Int J Mol Sci*. 2021. 22 (2): 572. <https://doi.org/10.3390/ijms22020572>.
3. Petrova E.S., Kolos E.A. Immunohistochemical study of rat sciatic nerve macrophages after injury and subperineural transplantation of mesenchymal stem cells. *J Evol Biochem Physiol*. 2023. 59(2): 577–585. <https://doi.org/10.1134/S0022093023020230>

АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ЭФФЕКТ АЗАБИЦИКЛО[3.1.0]ГЕКСАНОВ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА ТРАНСФОРМАЦИЮ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА У ФИБРОБЛАСТОВ ЛИНИЙ 3T3 И 3T3-SV40

С.А. Печковская*, Н.А. Князев, Н.А. Филатова

Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064
sapechkovskaya@gmail.com

Метастазирование опухолей в 90% случаев служит причиной смерти от онкологических заболеваний. Однако на данный момент в противоопухолевой терапии практически отсутствуют антиметастатические препараты, а известные агенты с антиинвазивным эффектом изучены относительно слабо и обладают высокой токсичностью и малой избирательностью [1]. В этой связи перспективным представляется подход к поиску лекарственных средств, называемых мигростатиками [2]. В данной работе представлены результаты доклинических исследований влияния синтезированных спиросочлененных азабицикло[3.1.0]гексанов на скорость роста, клеточный цикл и трансформацию актинового цитоскелета мышинных фибробластов линий 3T3 и 3T3-SV40.

Биодоступность синтезированных соединений, содержащих спиросочлененный азабицикло[3.1.0]гексановый фрагмент, проверяли *in silico* на соответствие правилу пяти Липинского [3]. Рассчитанные для большинства из них параметры ADMET (абсорбция, распределение, метаболизм, экскреция, токсичность) продемонстрировали хороший потенциал для дальнейшего исследования в экспериментах *in vitro*. Наиболее перспективные по вышеперечисленным параметрам вещества были протестированы на наличие антипролиферативной активности в отношении мышинных фибробластов линий 3T3 и 3T3-SV40.

Обработка исследуемыми веществами приводила к остановке клеточного цикла фибробластов в фазе G0/G1 и уменьшению количества клеток в синтетической S-фазе. Влияние на метастатический потенциал клеток оценивали по степени реорганизации актинового цитоскелета, в том числе за счет изменения количества клеток с филоподиями. Актиновый цитоскелет фибробластов 3T3 характеризуется наличием выраженных стресс-фибрилл у 71% клеток и скоплением агрегатов аморфного актина у 29% клеток. Фибробласты 3T3-SV40 изначально почти не имеют стресс-фибрилл, доля клеток с аморфным актином составляет 98%, а большинство клеток (86%) имеют филоподии. После обработки синтезированными веществами фибробластов линии 3T3 количество клеток со стресс-фибриллами уменьшилось до 3–38%, а количество клеток с аморфным актином, соответственно, увеличилось до 62–97%. Обработка культуры 3T3-SV40, напротив, привела к увеличению количества клеток со стресс-фибриллами до 7–30% за счёт уменьшения доли клеток с филоподиями до 7–18%. Полученные данные позволяют предположить, что исследуемые вещества не только обладают цитостатической активностью, но и способны индуцировать изменения в структуре актинового цитоскелета опухолевых клеток, что открывает широкие перспективы для изучения их действия *in vivo*.

1. Gandalovičová A., et al. 2017. Migrastatics—anti-metastatic and anti-invasion drugs: promises and challenges. *Trends Cancer*, 3(6): 391-406.
2. Trendowski M. 2014 Exploiting the cytoskeletal filaments of neoplastic cells to potentiate a novel therapeutic approach. *Biochim. Biophys. Acta* 1846: 599–616.
3. Vistoli, G.; Pedretti, A.; Testa, B. 2008. Assessing drug-likeness—What are we missing? *Drug Discov. Today*, 13: 285–294.

АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК ГРАНУЛЕЗЫ В РАСТУЩИХ АНТРАЛЬНЫХ ОВАРИАЛЬНЫХ ФОЛЛИКУЛАХ *SUS SCROFA DOMESTICUS*

А. О. Притужалова*, В.Ю. Денисенко, Т.И. Кузьмина, А. А. Курочкин, Е. И. Баранова, А. Л. Модина

ВНИИ генетики и разведения сельскохозяйственных животных филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста", г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, 196625.

* aklevakina14@mail.ru

Функциональная активность интрацитоплазматических компартментов клеток гранулезы детерминирует *in vivo* формирование яйцеклетки, компетентной к оплодотворению [1]. Вышесказанным обосновывается широкое использование монослоя и кокультур клеток гранулезы (КГ) в системах созревания донорских ооцитов животных, в частности *Sus Scrofa Domestica*. Цель настоящего исследования - оценка показателей жизнеспособности и функциональной активности митохондрий и липидома в клетках гранулезы, выделенных из фолликулов разного диаметра (\emptyset).

Объектом исследования служили клетки гранулезы (КГ) аспирированные из антральных овариальных фолликулов \emptyset : <3, 3-5, 5-8 мм. В исследовании применяли метод проточной цитометрии (цитометр CytoFlex, Beckman Coulter, USA). Анализу подвергались следующие показатели: доля мертвых клеток (5 мкг/мл пропидий йодид (PI), митохондриальная активность (1 мкм, TMRE), уровень интенсивности флуоресценции Nile Red (ИФ Nile Red) – индикатора функциональной активности липидома (10 мкм Nile Red). Выявлена достоверная разница в доле мертвых клеток, аспирированных из фолликулов \emptyset <3 и 5-8 мм (4 и 11% соответственно, $p < 0.05$). Уровень клеток с повышенной митохондриальной активностью из фолликулов \emptyset <3 мм оказался значительно ниже в клетках из фолликулов \emptyset 5-8 мм (11 и 23% соответственно, $p < 0.05$). Доля КГ из фолликулов \emptyset 3-5 мм с высоким уровнем ИФ Nile Red превысила таковую в фолликулах \emptyset <3 мм (51 и 41%, $p < 0.05$), тогда как доля клеток со средней ИФ Nile Red, снижалась по мере роста \emptyset фолликула до 3-5 мм (47 и 37%, $p < 0.05$). Корреляционный анализ показал отрицательную функциональную корреляцию между группами клеток с высокой и средней интенсивностью флуоресценции Nile Red по мере роста фолликула (-1,000, $p < 0.05$), что может указывать на процесс накопления липидных капель в КГ в динамике фолликулогенеза. Помимо этого, была выявлена достоверная корреляция между высоким уровнем ИФ Nile Red и митохондриальной активностью в КГ (0,500, $p < 0.05$), что может указывать на интенсивное потребление липидов КГ в качестве субстрата: нейтральные липиды, такие как триацилглицеролы и стероловые эфиры, служат предшественниками стероидных гормонов, а жирные кислоты метаболизируются посредством β -окисления в митохондриях с образованием АТФ [2]. Полученные данные дополняют имеющиеся сведения об особенностях функционирования клеточных компартментов КГ в динамике роста овариальных фолликулов *Sus Scrofa Domestica*, что позволит моделировать состав сред для экстраовариального созревания женской гаметы.

Работа выполнена в рамках проекта № 22-16-00084, поддержанного Российским Научным Фондом

1. Петров И. А., Дмитриева М. Л. Тканевые и молекулярные основы фолликулогенеза. Механизмы раннего фолликулярного роста / И. А. Петров, М. Л. Дмитриева, О. А. Тихоновская, М. С. Петрова, С.В. Логвинов // Проблемы репродукции. - 2017. - №23(5). - с. 33-41.
2. Serra D., Mera P., Malandrino M.I., Mir J.F., Herrero L. Mitochondrial fatty acid oxidation in obesity / Antioxid Redox Signal. – 2013. – 19(3). – pp. 269-84. doi: 10.1089/ars.2012.4875.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД РАЗЛИЧНЫХ ПРОИЗВОДИТЕЛЕЙ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И ОСТЕОГЕННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ ОСТЕОБЛАСТОВ

Д.К. Проскуракова¹, А.А. Захарова^{1,2}, А.Б. Малашичева^{1,2}

¹Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

²Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова Минздрава РФ, Санкт-Петербург, 197341

dashaprosk@gmail.com

Введение. Вопрос соответствия качества питательных сред различных производителей представляется важным для усовершенствования клеточных разработок различного уровня, так как первичные культуры клеток человека особенно чувствительны к нему.

Цель исследования. Оценить влияние питательных сред разного производства на эффективность пролиферации и дифференцировки в условиях *in vitro* на остеобласты - клетки костной ткани мезенхимного происхождения.

Материалы и методы исследования. Для оценки эффективности пролиферации методом построения кривой роста остеобласты в концентрации 20×10^3 клеток на лунку были посеяны в 12-луночный планшет. Клетки культивировали в высокоглюкозных средах Gibco (4,5 мг/л), Capricorn и ServiceBio с добавлением 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 15% FBS (Nu Clone), 2 mM L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина, при 37 °C, 5% CO₂, для подсчета снимали на 3, 6, 9 и 12 день. Для оценки эффективности остеогенной дифференцировки методом окрашивания ализариновым красным и методом ПЦР-РВ остеобласты в концентрации 80×10^3 и 180×10^3 клеток на лунку были посеяны в 20-луночный и 6-луночный планшет соответственно. Клетки культивировали в высокоглюкозных средах Gibco (4,5 мг/л), Capricorn, ServiceBio и в низкоглюкозной питательной среде Gibco (1,0 мг/л). Остеогенную дифференцировку индуцировали путем добавления в среду остеофакторов: 50 мкг/мл аскорбиновой кислоты, 0,1 мкМ дексаметазона и 10 mM β-глицерофосфата. В качестве контроля использовали остеобласты, культивировавшиеся без добавления остеофакторов. Клетки в остеогенных условиях культивировали в течение 4 дней для оценки методом ПЦР-РВ (оценивали изменение экспрессии генов-интереса RUNX2 и BMP2), и 21 день для оценки методом окрашивания ализариновым красным.

Результаты. Выявлены статистически значимые различия между скоростью роста клеток, культивированных на средах Gibco и Capricorn в последней контрольной точке. Статистически значимых отличий в парах Gibco-ServiceBio и ServiceBio-Capricorn обнаружено не было. Оценка эффективности остеогенной дифференцировки методом ПЦР-РВ выявила статистически значимое повышение уровня экспрессии генов интереса RUNX2 и BMP2 только на высокоглюкозной среде Gibco 4,5. В случае с низкоглюкозной средой Gibco 1,0 наблюдали статистически значимое изменение уровня экспрессии гена RUNX2, на средах Capricorn и ServiceBio на 4 день культивирования не было выявлено изменений экспрессии генов интереса. Окрашивание ализариновым красным показало, что среда Gibco 4,5 оказывает наибольшую степень влияния на процессы остеогенной дифференцировки остеобластов. Питательная среда Gibco 1,0, высокоглюкозные среды ServiceBio и Capricorn также способствует остеогенной дифференцировке и кальцификации внеклеточного матрикса, но в меньшей степени.

Выводы. В данной работе мы показали, что питательная среда Gibco 4,5 лучше других поддерживает пролиферацию и остеогенную дифференцировку остеобластов.

Исследование выполнено при поддержке гранта НШ-4664.2022.1.4.

ГИБЕЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЭПИДЕРМИСА (ITGα6^{high}CD71^{low}) ПРИ НАХОЖДЕНИИ В СУСПЕНЗИИ

О. С. Роговая*, О. И. Сулягина, Е. В. Алпеева, А. С. Рябченко, Е. А. Воротеляк
ФГБУН Институт Биологии Развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334
Rogovaya26f@ya.ru

Одно из приоритетных направлений современной биотехнологии – создание тканеинженерных конструкций, в том числе тканевых эквивалентов кожи. Ключевое значение при создании культивируемых кожных эквивалентов имеют стволовые клетки эпидермиса (СКЭ) – их доля в используемом клеточном материале и жизнеспособность – поскольку именно СКЭ обеспечивают долгосрочное обновление эпидермиса [1].

В связи с нехваткой соответствующих данных, настоящее исследование посвящено анализу жизнеспособности прогениторных кератиноцитов при нахождении в суспензии.

Популяцию СКЭ выявляли путём иммуноцитохимического окрашивания как кератиноциты с высоким уровнем поверхностного рецептора ITGα6 и низким уровнем рецептора трансферрина (ITGα6^{high}CD71^{low}) [2]. Жизнеспособность клеток оценивали путём окрашивания аннексином V и пропидий йодидом или с использованием LIVE/DEAD™ Kit (Invitrogen, США). Результаты анализировали методом проточной цитофлуориметрии.

Согласно полученным данным, через 1.5 ч пребывания в суспензии жизнеспособность сохраняли всего $3.7 \pm 0.9\%$ СКЭ, в то время как жизнеспособность остальных клеток в суспензии составляла $82.7 \pm 6.4\%$ ($p \leq 0.01$, **); основной путь гибели – апоптоз. Массовая гибель СКЭ в суспензии наступала уже в течение получаса: через 30 мин $88.7 \pm 3.8\%$ СКЭ были мертвы. Важно отметить, что общая жизнеспособность кератиноцитов снижалась всего на $2.3 \pm 0.5\%$. Таким образом, практически полная гибель функционально значимого пула клеток может оставаться незамеченной.

Биологическое значение. Селективная гибель СКЭ, высоко экспрессирующих ITGα6, ответственного за клеточную адгезию, предположительно связана с нахождением в суспензии без контакта с субстратом [3]. Косвенным подтверждением этой гипотезы может являться постепенное снижение жизнеспособности по мере повышения уровня экспрессии ITGα6 (с $11.1 \pm 1.2\%$ до $1.3 \pm 0.5\%$ для CD71^{low} клеток). Активация апоптотической гибели в популяции СКЭ при отсутствии контакта с субстратом может служить механизмом предотвращения свободной миграции клеток с высоким клоногенным потенциалом.

Практическое значение. При работе с фракцией кератиноцитов следует максимально сокращать время пребывания в суспензии для предотвращения истощения пула СКЭ (нами показано снижение доли СКЭ с 2.7 ± 0.3 до 1.2 ± 0.5 при пассировании в ряду P0 – замораживание – P1). Необходимо избегать процедур, предполагающих длительное пребывание в суспензии, в т.ч. селективного выделения СКЭ методом магнитного или флуоресцентно-активируемого клеточного сортирования.

Финансирование работы. Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ, Соглашение № 075-15-2021- 1063 от 28.09.2021 г.

1. Giangreco A., Qin M., Pinter J.E., Watt F.M. Epidermal stem cells are retained in vivo throughout skin aging // *Aging Cell*. 2008. 7(2). P. 250-259. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00372.x.
2. Metral E., Bechetoille N., Demarne F., Rachidi W., Damour O. α6 Integrin (α6^{high})/Transferrin Receptor (CD71)^{low} Keratinocyte Stem Cells Are More Potent for Generating Reconstructed Skin Epidermis Than Rapid Adherent Cells // *Int J Mol Sci*. 2017. V.18. 282. doi: 10.3390/ijms18020282.
3. Tiberio R., Marconi A, Fila C, Fumelli C, Pignatti M, Krajewski S, Giannetti A, Reed JC, Pincelli C. Keratinocytes enriched for stem cells are protected from anoikis via an integrin signaling pathway in a Bcl-2 dependent manner // *FEBS Lett*. 2002. V. 524(1-3). P.139-44. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03040-5.

**МОРФОГЕНЕЗ КОЖИ И YAP/TAZ СИГНАЛЛИНГ В МОДЕЛИ
ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЭМБРИОИДНЫХ ТЕЛЕЦ ИЗ ИПСК ЧЕЛОВЕКА В
КОЖНЫЕ ОРГАНОИДЫ**

А. А. Рябинин^{1*}, М. Д. Панкратова^{1,2}, Е. П. Калабушева¹, Е. А. Воротеляк¹

¹ Институт биологии развития РАН им. Н. К. Кольцова, Москва, Россия, 119334

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия, 119234
andrey951233@mail.ru

Актуальной задачей для современной регенеративной медицины и клеточной биологии и эмбриологии является разработка технологий генерации *in vitro* и пересадки живых эквивалентов кожи (ЖЭК), которые могут быть использованы для ускоренной регенерации повреждений кожи, а также в качестве модели для изучения морфогенеза кожи и для тестирования различных препаратов и физических воздействий в фармакологии. Современным подходом к получению ЖЭК является генерация кожных органоидов из индуцированных плюрипотентных клеток человека (чИПСК), которые могут быть получены из любых аутологичных соматических клеток. Помимо этого, дифференцировка чИПСК в трехмерных органных структурах в теории могут быть использованы как модели эмбрионального развития соответствующих органов и тканей.

Целью нашей работы было получение кожных органоидов, содержащих в своей структуре волосные фолликулы (ВФ), *in vitro* без использования сыворотки и инструментов генетической модификации, в результате направленной дифференцировки эмбриональных телец из чИПСК, и изучение активности белка YAP в различных структурах кожных органоидов в ходе их морфогенеза. В процессе дифференцировки на 4 разных временных точках органоиды фиксировали и использовали для выявления маркеров различных субпопуляций клеток, характерных для конкретной стадии развития кожи, при помощи иммуногистохимических методов. На всех стадиях была выявлена активность белка YAP. При помощи анализа данных секвенирования РНК на уровне одиночных клеток, полученных на 6, 29 и 48 днях дифференцировки, был проанализирован уровень экспрессии генов-участников YAP/TAZ сигнальной системы: YAP, TAZ, TEAD1, TEAD2, TEAD3, TEAD4, CYR61 и CTGF. Также на данных сроках дифференцировки был проведен транскрипционный анализ срезов свежемороженых органоидов на базе платформы Visium (10x Genomics) с целью получения данных о пространственных паттернах экспрессии компонентов YAP/TAZ сигнальной системы в различных структурах в составе органоидов.

В ходе дифференцировки эмбриональных телец удалось получить кожные органоиды с ВФ. В полученных органоидах на разных стадиях их развития была выявлена активность YAP/TAZ сигнальной системы, были найдены закономерности в распределении экспрессии разных компонентов YAP/TAZ сигнальной системы среди разных субпопуляций клеток. В дальнейшем планируется продолжить изучение морфогенеза кожи на данной модели.

Исследование было поддержано грантом РФФ № 21-74-30015.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ pRb И β -КАТЕНИНА В ОПУХОЛЕВОЙ И НОРМАЛЬНОЙ ТКАНИ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА

В.М. Рябов¹, Н.И. Тяпкин², А.П. Родимцев¹, Б.В. Попов^{1*}

¹ Институт Цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

² Ленинградский региональный клинический онкологический диспансер имени Л.Д. Романа, МЗ РФ, Кузьмолово, 188663

*borisvp478@gmail.com

Рак предстательной железы (РПЖ) является самым распространенным онкологическим заболеванием у мужчин в развитых странах. РПЖ проходит две стадии развития. Первая стадия, локализованный РПЖ, может длиться долгое время в неактивной форме, не требующей медицинского вмешательства. В некоторых случаях локализованный РПЖ неожиданно трансформируется в агрессивную метастатическую форму с быстрым смертельным исходом. Механизм перехода дремлющей формы РПЖ в метастатическую форму до конца не понятен. Вероятно, сигнальные пути опухолевого супрессора pRb и протоонкогена β -катенина играют важную роль в развитии РПЖ, но их взаимодействие в патогенезе этого заболевания остается недостаточно изученным.

Исследование механизмов развития опухолей различных тканей свидетельствует о том, что в начальной стадии развития опухоли pRb может терять некоторые свойства опухолевого супрессора, что создает преимущества для размножения опухолевых клеток. В некоторых случаях, например при раке толстой кишки, потеря онкосупрессорных свойств pRb происходит при его взаимодействии с β -катенином. Для изучения подобного взаимодействия при РПЖ мы использовали методы иммуноблоттинга, иммунопреципитации, ПЦР в реальном времени, и иммунофлюоресцентной микроскопии. Мы нашли, что экспрессия генов RB и β -катенина (*CTNNB1*) в опухолевой и нормальной ткани предстательной железы (ПЖ) не отличается. Отличительной чертой было то, что β -катенин не иммунопреципитировался специфическими антителами к его С-концевому фрагменту из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ, но был обнаружен в подобных опытах в экстрактах контрольных клеток линии T98G. Коиммунопреципитация с использованием антител к pRb из экстрактов опухолевой и нормальной ткани ПЖ подтвердила физическое взаимодействие pRb и β -катенина в ПЖ. Эти результаты позволяют предположить, что pRb и β -катенин физически взаимодействуют в предстательной железе, что может представлять собой важный механизм в патогенезе РПЖ. В клетках линии T98G такое взаимодействие происходит, вероятно, через С-концевой фрагмент β -катенина, но в клетках ПЖ оно осуществляется другим путем, поскольку С-концевой фрагмент β -катенина оказывается экранированным от взаимодействия, возможно, из-за его физической ассоциации с pRb.

Дальнейшие исследования на более широкой выборке пациентов и использование других методов анализа могут дать дополнительные данные для подтверждения этих результатов и более полного понимания механизмов развития РПЖ.

Работа поддержана грантом РФФИ № 23-25-00162.

АНАЛИЗ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРОВАННЫХ МИКРОВЕЗИКУЛ С ПОМОЩЬЮ СКАНИРУЮЩЕЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

С.В. Сабирова^{1,*}, А.А. Будюкова¹, М.О. Гомзикова

¹Казанский (Приволжский) Федеральный Университет
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18

* - sirinakurbangaleeva@gmail.com

Внеклеточные везикулы (ВВ) - это округлые микроструктуры, образующиеся в клетках и участвующие во многих процессах, происходящих в организме. Клетки сообщаются друг с другом, используя ВВ в качестве переносчика. Поэтому эта естественная система доставки является перспективным инструментом регенеративной медицины. Однако ВВ не могут быть получены в больших количествах. Для увеличения производства везикул был разработан метод получения везикул с использованием вещества цитохалазин В, которое дезорганизует клеточный цитоскелет, делает клетки более пластичными, и везикулы отщепляются при вихревом перемешивании. Однако ранее не было проведено сравнительного анализа микроскопической структуры ВВ и цитохалазин В-индуцированных микровезикул (МВ-ЦВ). Поэтому мы охарактеризовали ВВ и МВ-ЦВ с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ).

Для выделения ВВ собирали кондиционированную среду из мышинных мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и затем центрифугировали при 300g в течение 5 мин, при 300g в течение 10 мин, при 2300g в течение 25 мин и при 10 000g в течение 45 мин при 4 °С. Супернатант переносили в пробирки для ультрацентрифуги BECKMAN L70 и центрифугировали при 100 000g в течение 90 мин при 4 °С.

МВ-ЦВ получали из МСК путем обработки цитохалазином В (C6762, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин (37 °С, 5% CO₂). Затем суспензию клеток энергично перемешивали в течение 30 с и подвергали последовательному центрифугированию при тех же условиях, что и ВВ. Нами были проанализированы осадки, полученные после центрифугирования при 2300g, 10 000g и 100 000g. ВВ и МВ-ЦВ фиксировали в 10%-ном формалине в течение 15 мин, обезвоживали с помощью градуированного ряда спиртов и высушивали при комнатной температуре.

Было выявлено, что ВВ и МВ-ЦВ представляют собой сферические микроструктуры. После центрифугирования 2300g фракция ВВ содержала частицы размером 50-700 нм, а МВ-ЦВ, полученные при 2300g, имели размер 50-900 нм. Центрифугирование 10000g приводило к седиментации ВВ, размер которых варьировал в пределах 50-400 нм, и седиментации МВ-ЦВ, размер которых варьировал в пределах <50-600 нм. Применяя ультрацентрифугирование при 100 000g, мы осаждали ВВ с размером <50-400 нм и МВ-ЦВ с размером <50-500 нм.

Таким образом, мы показали, что размер и морфология индуцированных цитохалазином В микровезикул и внеклеточных везикул сходны, однако размер индуцированных везикул был на 100-200 нм больше, чем ВВ, на всех этапах центрифугирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке исследовательского проекта РНФ № 23-25-10046, в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИИ ДЕРМАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ ЧЕЛОВЕКА ОТ ДОНОРА ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА

Е.И. Сахенберг*, Н.А. Красковская, А.Н. Шатрова, Н.С. Шарлаимова, М.Г. Хотин,
Н.А. Михайлова

Институт Цитологии Российской Академии наук, Санкт-Петербург, 194064

* lenasakhenberg@yandex.ru

Средний возраст населения Земли стремительно растет. Особенно остро эта тенденция заметна в развитых странах. Поэтому современная медицина все больше уделяет внимание обеспечению активного долголетия, борьбе с заболеваниями, развивающимися в пожилом и преклонном возрастах. Разработка геропротекторных препаратов требует наличия адекватных тест систем и моделей как *in vivo*, так и *in vitro*. Разработка подобных моделей важная и актуальная задача. Успешно применяется методика искусственного состаривания клеток в культуре. Однако у этого подхода есть свои ограничения, в том числе связанные с потерей эпигенетических меток, накапливаемых с возрастом.

В настоящей работе была получена неиммортилизованная линия дермальных фибробластов человека от донора пожилого возраста – женщина 68 лет. Получено информированное добровольное согласие донора. Клетки переведены в культуру и охарактеризованы по ряду параметров, позволяющих составить паспорт клеточной линии.

Клетки выделены из фрагмента глазного века методом механической дезагрегации. Культивировали клетки в среде, содержащей 90% ДМЕМ/F12 (Биолот, Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США). Пересев проводили с использованием раствора трипсина (0,25%) – версена (0,2 %) по достижению ими 85-90 % монослоя – на поздней логарифмической стадии роста. Кратность посева 1:2-1:4. Клетки активно пролиферируют. Жизнеспособность после криоконсервации составляет 90 %. Бактериальной, грибковой и микоплазменной контаминаций в полученных клетках не выявлено.

Было показано, что клетки под действием индукторов способны к остеогенной и адипоцитарной дифференцировкам. Методом проточной цитометрии было детектировано положительное окрашивания клеток на поверхностные маркеры CD44, CD73, CD90, CD105, и отсутствие окраски на CD34, HLA-ABC и HLA-DR, что соответствует фенотипу мезенхимных стволовых клеток.

Полученная клеточная линия может быть использована для изучения геропротекторных свойств различных лекарственных препаратов на клеточном уровне. Для подобных исследований могут быть использованы как непосредственно фибробласты, так и полученные из них клетки. Например, индуцированные нейроны, получаемые на прямую из фибробластов методикой трансдифференцировки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и соответственно дифференцированные из них клетки различных типов.

Исследование выполнено в рамках проекта 15.БРК.21.0011, поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1063).

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА НА НЕЙРОГЕНЕЗ В СОСУДИСТОМ СПЛЕТЕНИИ КРЫС

К.С. Сергеева¹, И.А. Черенков¹, В.Г. Сергеев*^{1,2}

¹ ФГБОУ ВО «Удмуртский государственный университет», Ижевск, 426034

² ФГБОУ ВО «Ижевская медицинская академия», Ижевск, 426034

*- cellbio@ya.ru

«Традиционными» нейрогенными областями мозга грызунов считаются субвентрикулярная зона латеральных желудочков [1] и субгранулярная зона зубчатой извилины гиппокампа [2]. Вместе с тем накапливаются свидетельства о наличии стволовых клеток (НСК) в других областях мозга, включая кору больших полушарий, полосатое тело [3], спинной мозг [4] и сосудистое сплетение мозга (ССМ) [5, 6, 7]. Исследование нейрогенного потенциала ССМ и условий, необходимых для его реализации, представляет особый интерес в силу доступности этого образования для хирургического изъятия из желудочков мозга и дальнейшего использования в качестве источника аутологичных нейрогенных клеток.

В нашей работе исследовали влияние воспаления различной интенсивности на индуцирование нейрогенеза в ССМ и интенсивность синтеза в эпителиальных клетках ССМ трофических факторов. 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 выявляли локализацию в ССМ и количество клеток экспрессирующих NCAM, TGF- β и BDNF. Через 2 дня после введения малой дозы липополисахарида в эпителии ССМ отмечалось достоверное увеличение количества клеток, иммунопозитивных к этим маркерам, тогда как большая доза редуцировала их количество. Гистотопография NCAM- экспрессирующих клеток свидетельствовала об интенсификации в условиях эндотоксиновой стимуляции малой интенсивности миграционной активности нейрональных предшественников из ССМ в подэпендимальный слой субвентрикулярной зоны мозга. Таким образом, обнаружено наличие в составе эпителиальных клеток сосудистого сплетения мозга крыс нейрональных стволовых клеток, дифференцировка и миграционная активность которых в паренхиму мозга индуцируется под действием факторов, образуемых в условиях воспаления низкой интенсивности.

1. Alvarez-Buylla A., Garcia-Verdugo J.M. Neurogenesis in adult subventricular zone // *J Neurosci.* - 2002.- Vol.22, №3. - P.629-634.
2. Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // *J Neurosci.* -1996. - Vol.16, №6.- P.2027 - 2033.
3. Willaime-Morawek S., van der Kooy D. Cortex- and striatum- derived neural stem cells produce distinct progeny in the olfactory bulb and striatum // *Eur J Neurosci.* – 2008. – Vol. 27, №9. – P.2354 - 2362.
4. Parr A.M., Kulbatski I., Zahir T., Wang X., Yue C., Keating A., Tator C.H. Transplanted adult spinal cord-derived neural stem/progenitor cells promote early functional recovery after rat spinal cord injury // *Neuroscience.* – 2008. – Vol.155, №3. – P.760-770.
5. Huang S.L., Shi W., Jiao Q., He X.J. Change of neural stem cells in the choroid plexuses of developing rat // *Int J Neurosci.* – 2011. – Vol.121, №6. – P.310-315.
6. Itokazu Y., Kitada M., Dezawa M., Mizoguchi A., Matsumoto N., Shimizu A., Ide C. Choroid plexus ependymal cells host neural progenitor cells in the rat // *Glia.* – 2006. – Vol.53, №1. – P.32 – 42.
7. Prasongchean W., Vernay B., Asgarian Z., Jannatul N., Ferretti P. The neural milieu of the developing choroid plexus: neural stem cells, neurons and innervation // *Front Neurosci.* -2015. – Vol.9. – P.103.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ПРОТООНКОГЕНА *Ras85D* С ПОМОЩЬЮ МИКРОРНК

Е.А. Сивопляс^{1,2*}, А.М. Куликов²

¹Московский педагогический государственный университет, Москва, Россия

²Институт биологии развития, Москва, Россия

* - sivoplyas-ekater@mail.ru

Очень малые РНК, или микроРНК представляют собой регуляторы экспрессии генов, присутствующие, по-видимому, у всех эукариот. В цитоплазме, где осуществляется контроль трансляции, конкретная микроРНК ищет мишень на мРНК. В геноме человека насчитывают 1000 генов, кодирующих микроРНК [1]. Показано, что запуск транскрипции находится под контролем некоторых микроРНК, связывающихся с коротким участком в начале гена. Сейчас также установлено, что на всех стадиях развития многие сотни микроРНК контролируют тысячи мРНК [2]. Каждая микроРНК может контролировать сотни мРНК.

Высококонсервативный протонкоген *Ras85D* имеет нуклеотидную последовательность, которая мало изменчива у различных таксонов от дрожжей до млекопитающих [2]. Продукт этого гена – белок – важный участник ферментативной реакции, участвующей в делении, который передает сигнал от рецепторов к фосфотрансферазам. Синтез данного белка осуществляется в течение всей жизни у эукариот, а степень экспрессии зависит от регулирующих механизмов. Ошибки в последовательности таких генов при делении клетки, приводят к канцерогенезу.

Для подтверждения связывания микроРНК с мРНК мы использовали репортёрный ген флюоресцирующего белка GFP. На конфокальном микроскопе была показана различная степень свечения у контрольной линии по сравнению с экспериментальными, несущими сайты связывания с микроРНК. Белковый анализ проводился методом вестерн-блот с использованием антител для флюоресцирующего белка GFP. Показано, что экспрессионная активность гена *Ras85D* различается в зависимости от стадии развития и регулируется с помощью кластера микроРНК. Структурные перестройки в регуляторной области гена *Ras85D* приводят к формированию аллелей с летальным эффектом или, по крайней мере, с резко сниженными показателями жизнеспособности. В природе такие аллели сохраняются исключительно в гетерозиготном состоянии и быстро теряются вследствие отбора и генетико-автоматических процессов.

Работа выполнена при поддержке гранта грантом РФФИ № 16-34-00840 мол_а.

1. Von Roretz, C., and Gallouz, I. E. Decoding ARE-mediated decay: is microRNA part of the equation? J. Cell. Biol. 2008 181, 189-194
2. Lau, N. C., Lim, E. P. et al. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *C. elegans*. Science 2001 294, 858-864
3. Goodsell D. S. The molecular perspective: the ras oncogene. 1999 Oncologist 263-264.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕЗЕНХИМНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ГЛОМЕРУЛОНЕФРИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Л.П. Сигарева^{1,*}, А.А. Кокорина^{1,2}, Е.В. Михайлова^{1,3}, С.В. Кромский¹, В.Н. Александров^{1,2}

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 194100

²Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования Военно-медицинская академия имени С. М. Кирова Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург, 194044

³Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064
sigaryowa@yandex.ru

Введение. Аутоиммунные гломерулонефриты (АГН) – склонные к хроническому течению иммуноопосредованные двусторонние воспалительные заболевания почек, основной локализацией которых является базальная мембрана почечного клубочка с постепенным вовлечением в патологический процесс остальных почечных структур. Данные заболевания характеризуются длительным латентным периодом, что приводит к случайному обнаружению заболевания значительно позже начала изменений в функционировании почек. Часто АГН являются причиной инвалидизации пациентов из-за малоэффективных и токсичных методов классической терапии (применение цитостатиков и стероидных гормонов) [1]. Разработка протоколов лечения с применением мезенхимных мультипотентных стромальных клеток (ММСК) может позволить снизить риски инвалидизации и увеличить эффективность стандартных методов лечения.

Материалы и методы. В качестве модели заболевания выбрали активный нефрит Хеймана, хорошо воспроизводимый на крысах линии Вистар. Эксперимент продолжали 120 сут. При моделировании использовали самок крыс двухмесячного возраста (n=18), которым вводили 3 мл антигенной эмульсии почек родительского организма на полном адьюванте Фрейнда (BD, США) внутривентрально на 1, 4, 7 и 21 сутки эксперимента [2]. На 22 сутки проводили однократную системную трансплантацию ММСК во внешнюю яремную вену в количестве $3 \cdot 10^6$ клеток на кг [3]. Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом. В качестве контроля полученного заболевания использовали интактных крыс (n=5), для контроля эффективности терапии – крыс с моделью АГН (n=15). Источником донорских ММСК являлся костный мозг здоровых самок крыс четырёхмесячного возраста. Клетки культивировали на полной ДМЕМ (Gibco, США) при добавлении 10 % FBS (Gibco, США) в инкубаторе (37±1 °С, влажность 95±5 %, концентрация CO₂ 5±1 %) в пластиковых флаконах (Corning Inc., США), до трансплантации осуществляли не менее 3 пересевов. В ходе эксперимента на спектрофотометре Epoch 2 (BioTek, США) в крови оценивали концентрацию креатинина и мочевины, в моче – общий белок (реактивы – НПЦ «Эко-Сервис», Россия; BioSystems S.A., Испания). Данные представлены в виде медианы и квартилей (Me [Q1; Q3]), для их сравнения использовали критерий Вилкоксона. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. Модель АГН получали к 21 сут эксперимента. В крови больных животных концентрация креатинина возросла с 49,25 [44,48; 55,28] до 63,51 [60,78; 66,91] мкмоль/л ($p < 0,05$) и мочевины с 5,49 [4,99; 6,55] до 7,68 [5,88; 8,8] ммоль/л ($p < 0,05$). Увеличение концентрации белка в моче от 0,104 [0,078; 0,125] до 1,015 [0,988; 1,064] г/л указывало на развитие протеинурии. На 82 сут эксперимента часть показателей крови и мочи достоверно нормализовывались: в крови концентрация мочевины снижалась до 6,65 [6,34; 7,52] ммоль/л, а креатинина – до 48,78 [45,32; 50,22] мкмоль/л. Концентрация белка в моче также

снижалась, хотя и отличалась от показателя интактных животных (0,219 [0,207; 0,224] г/л, $p < 0,05$). На 120 сут эксперимента все показатели были стабильны.

Заключение. Представленная модель нефрита Хеймана хорошо воспроизводится в эксперименте, что подтверждается развитием протеинурии, увеличением концентрации мочевины и креатинина в крови. Трансплантация аллогенных ММСК улучшает биохимические показатели крови и мочи, характеризующие течение воспалительного процесса в почках [3]. Полученные результаты подтверждают актуальность биомедицинских разработок с применением культивируемых ММСК для терапии аутоиммунных заболеваний почек.

1. Willam, G. Couser et al. The etiology of glomerulonephritis: roles of infections and autoimmunity // *Kidney international*. 2014. Vol. 86, №5. P.905-914
2. Mary, H. Foster et al. Optimizing the translational value of animal models of glomerulonephritis: insights from recent murine prototypes // *Am J Physiol Renal Physiol*. 2016. №311(3), P.F487-495, doi: 10.1152/ajprenal.00275.2016
3. Kunter, U. et al. Mesenchymal stem cells as a therapeutic approach to glomerular diseases: benefits and risks // *Kidney Int Suppl*. 2011. Vol. 1(3), P.68-73, doi: 10.1038/kisup.2011.16

МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНЫХ ФИБРИЛЛ КОЛЛАГЕНА I И V ТИПА И ИХ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ КЛЕТОК РАЗЛИЧНЫХ ЛИНИЙ.

М.Ю. Сироткина*¹, А.К. Зенкова¹, С.В. Шабельников¹, А.В. Нащекин², Ю.А. Нащекина¹

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

² Физико-технический институт им. А.Ф. Иоффе, Санкт-Петербург, 197350

*ms778321@gmail.com

Коллаген I типа благодаря своей высокой биосовместимости является широко используемым материалом в тканевой инженерии. Как основной компонент внеклеточного матрикса (ВКМ), коллаген I типа имеет высокий потенциал для создания биомиметичных тканеинженерных конструкций. В тканях коллаген I типа присутствует в структурированном фибриллярном состоянии. От диаметра фибрилл коллагена зависят свойства ткани, например, механические свойства связок или прозрачность стромы роговицы. Диаметр фибрилл регулируется другими биополимерами ВКМ в том числе коллагеном V типа. Коллаген V типа формирует с коллагеном I типа гибридные фибриллы, уменьшая их диаметр. Несмотря на то, что коллаген V типа открыт почти пол века назад, не так много информации о взаимодействии гибридных фибрилл коллагена I и V типа с клетками разных линий.

Целью данной работы является формирование гибридных фибрилл на основе коллагенов I и V и сравнение реакции клеток линий различного тканевого происхождения. Диаметр фибрилл оценивали методом сканирующей электронной микроскопии с последующей обработкой изображений в программном обеспечении ImageJ. Жизнеспособность исследовали с применением МТТ-теста. Адгезию, пролиферацию и распластанность рассматривали с помощью флуоресцентной микроскопии путем окрашивания DAPI и родамин-фаллоидином. Подсчет клеток и измерение площади осуществлялся при помощи ImageJ.

В результате подтверждено, что присутствие коллагена V типа способствует уменьшению диаметра гибридных фибрилл. Показаны дозозависимые отличия в адгезии, пролиферации, жизнеспособности и распластанности, клеток линии SIRC и fetMSC. Также дополнительно исследована разница жизнеспособности клеток на покрытии из молекулярного коллагена V типа и на покрытии из гибридных фибрилл. Показано, что клетки показывают меньшую жизнеспособность на молекулярном коллагене V типа, чем на коллагене в составе гибридных фибрилл. Предположительно причиной является демаскировка участков на молекуле коллагена V типа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (Соглашение No 21-74-20120).

УЛУЧШЕНИЕ СТРУКТУРЫ НЕЙРОМЫШЕЧНЫХ СОЕДИНЕНИЙ У МЫШЕЙ MDX ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА В РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ

А.В. Соколова*, В.М. Михайлов

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург 194064
avsokolova@inbox.ru

Мышечная дистрофия Дюшенна (МДД) – это одна из самых тяжелых мышечных дистрофий, вызываемая мутациями в гене дистрофина. В последние десятилетия стволовые клетки стали рассматриваться в качестве нового терапевтического средства для лечения ряда заболеваний, в частности МДД. Исследования проводятся, в том числе и на животных моделях заболевания, таких как мыши mdx. Для мышей mdx характерно отсутствие синтеза дистрофина, усиление гибели поперечнополосатых мышечных волокон (ППМВ), наличие ППМВ с центрально расположенными ядрами и нарушения структуры нейромышечных соединений (НМС). Ранее нами было описано нарастание доли дистрофин-положительных ППМВ в мышцах мышей mdx и улучшение структуры НМС после сингенной немиелоаблативной трансплантации клеток костного мозга (ККМ). В данной работе мы исследовали влияние немиелоаблативной аллогенной трансплантации ККМ в различных условиях на мышцы мышей mdx. Мышам mdx проводили внутривенную трансплантацию ККМ мышей СЗНА через сутки после облучения лучами Рентгена в дозе 2 или 3 Гр, после трансплантации животным дополнительно вводился Эндоксан (циклофосфамид) в качестве иммуносупрессора в различных дозировках.

В результате наиболее успешно аллогенная трансплантация прошла в группе мышей mdx, которым трансплантировали ККМ мышей СЗНА после облучения в дозе 3 Гр и дополнительно внутрибрюшинно вводили Эндоксан в дозе 30 мг/кг (2 укола на первый и второй день после введения ККМ). В этой группе достоверно по сравнению с контрольными мышцами mdx возростала доля дистрофин-положительных ППМВ с $0,86 \pm 0,15$ % до $4,6 \pm 0,5$ %, возростала доля ППМВ, не имеющих центрально расположенных ядер, с $11,4 \pm 1,3$ % до $23,8 \pm 1,6$ %, и снижалась доля погибших ППМВ с $3,1 \pm 0,6$ % до $0,7 \pm 0,3$ %. Известно, что у мышей mdx большая часть НМС сформирована кластерами ацетилхолиновых рецепторов (АХР) в форме отдельных островков. После трансплантации ККМ во всех экспериментальных группах наблюдалось увеличение, по сравнению с контрольными мышцами mdx, доли НМС, сформированных кластерами АХР в форме ветвей, характерных. Показано, что в экспериментальной группе мышей mdx, для которой получено максимальное нарастание доли дистрофин-положительных ППМВ, уменьшается количество кластеров АХР, составляющих НМС, при этом средняя площадь кластера возрастает. Разрушение крупных кластеров АХР в составе НМС у мышей mdx ряд авторов связывает с постоянно повторяющимися циклами дегенерации-регенерации ППМВ. Другие исследователи считают, что именно дистрофин задействован в организации больших кластеров АХР в составе НМС и, соответственно, его отсутствие приводит к распаду больших кластеров АХР на мелкие. По нашим данным, увеличение доли НМС с кластерами АХР в виде ветвей наблюдается не только в группе опытных животных, с достоверным снижением доли погибших ППМВ по сравнению с контрольными мышцами mdx, но и во всех остальных экспериментальных группах.

Таким образом, немиелоаблативная трансплантация ККМ мышей СЗНА вызывает у мышей mdx нарастание доли дистрофин-положительных ППМВ, нарастание доли ППМВ без центрально расположенных ядер, а также улучшение структуры НМС. Полученные данные позволяют рассматривать данный метод как способ лечения мышечной дистрофии у мышей mdx и улучшение структуры их НМС.

ЭКСПРЕССИЯ МОБИЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА.

Афанасьев Р.В.^{1,2}, Соловьева А.И.², Енукашвили Н.И.^{2,3}

¹Тюменский государственный университет, 625003, г. Тюмень, ул. Володарского 6

²Институт цитологии РАН, 194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр. 4

³Центр клеточных технологий «Покровский», 199106, г. Санкт-Петербург Большой проспект Васильевского острова, 85 корпус 2

Транспозоны — это мобильные генетические элементы, потенциально способные изменять свою локализацию в геноме. В зависимости от типа строения их принято делить на 2 класса: ДНК-транспозоны и ретротранспозоны. Большая часть из них остается “молчащей” и не способна к перемещению, однако не стоит недооценивать их вклад в геномы организмов. Современные методы геномики показали, что транспозоны вовлечены в самые разные процессы, начиная с регуляции генов и заканчивая крупными эволюционными приобретениями, которые привели к повышению уровня организации организмов. Показано, что экспрессия некоторых эндогенных ретровирусов жизненно необходима для поддержания стволовости клеток. Характерной особенностью стволовых клеток является сниженный уровень метилирования ДНК, что, в свою очередь, снимает некоторые ограничения с транскрипции мобильных элементов. Однако вопрос о том, как происходит изменение паттерна экспрессии транспозонов при переходе от тотипотентности к плюрипотентности и дальнейшей специализации клеток остается открытым. В данной работе мы сосредоточились на выявлении паттерна экспрессии мобильных элементов в стволовых клетках разных типов с помощью методов биоинформатического анализа.

Мы использовали транскриптомы культур мезенхимальных (МСК), эмбриональных (ЭСК), нейрональных (НСК) и гематопозитических (ГСК) стволовых клеток из открытой базы данных NCBI. Кроме нейрональных, которые были дифференцированы из индуцированных плюрипотентных клеток, остальные получены из соответствующих первичных культур. С помощью программы Kallisto мы количественно оценили экспрессию транспозонов, для референса использовали базу повторов человека из Dfam(dfam.org). Сперва мы выяснили, какие повторы транскрибируются у разных стволовых клеток и путем построения диаграмм Венна определили общие и уникальные элементы. Общими для всех клеток являются 714 повторов. Максимальное число уникальных повторов (45) обнаружено в транскриптомах НСК. Минимальное - в МСК (1 ДНК-транспозон Arthur). В ЭСК выявлено 8 уникальных транскриптов транспозонов. У НСК преобладает экспрессия уникальных эндогенных ретровирусов и MER элементов, но не совсем ясно, является это следствием специализации, или остаточным эффектом от индукции плюрипотентности. В список уникальных экспрессируемых элементов ГСК вошли 12 повторов, из них более половины - ДНК-транспозоны семейств Tc1/mariner и hAT. ЭСК экспрессируют 8 уникальных элементов, также представленных в основном эндогенными ретровирусами и ДНК-транспозонами семейства hAT. Далее мы рассчитали, какие из повторов имеют значимые различия в уровнях транскрипции. При анализе дифференциальной экспрессии повторов выявлено 351 элемент с достоверными различиями, причем наиболее сильный разброс демонстрируют ретроэлементы Alu, HERVK, L1, SVA_D и THE1-int. Таким образом, мы показали, что при специализации стволовые клетки приобретают свой характерный паттерн экспрессии повторов, который может быть связан с системой эпигенетической регуляции.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и Высшего образования (соглашение №075-15-2021-1075).

БЕЛКИ HMGB1/2 И ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭСК МЫШИ

Т.Ю. Старкова*, А.Н. Томилин

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии Российской академии наук», Санкт-Петербург, 194064

* t.starkova@incras.ru

Целью нашей работы является изучение индивидуальной и совместной роли двух представителей белков HMGB группы, HMGB1 и HMGB2, в хроматине ЭСК мыши. Эти белки характеризуются высокой гомологией, как первичной структуры, так и пространственной организации ДНК-связывающих доменов. Основными отличиями в структуре данных белков является длина С-концевого фрагмента. Белки данной группы взаимодействуют с линкерным участком ДНК между нуклеосомами и изгибают двойную спираль макромолекулы в сайте связывания, чем облегчают функционирование на ДНК различных регуляторных белков и их комплексов, в том числе транскрипционных факторов [1, 2]. Таким образом, HMGB1 и HMGB2 являются важными участниками таких клеточных процессов как рекомбинация, транскрипция, репарация ДНК [1-3].

Основным направлением нашего исследования являлось выявление роли HMGB1 и HMGB2 белков в процессе самообновления и дифференцировки эмбриональных стволовых клеток мыши. В рамках поставленных задач исследования нами были созданы линии мышинных эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), нокаутные по *HmgB1*, *HmgB2* и *HmgB1;HmgB2* одновременно. В процессе работы было показано, что нокаут генов *HmgB1*, *HmgB2* оказывает влияние на фенотип ЭСК, пролиферативную активность клеток, метаболизм клеток, уровень экспрессии маркеров плюрипотентности мЭСК, тем не менее, не приводит к утере жизнеспособности и плюрипотентного статуса.

Мы надеемся, что полученные в ходе выполнения работы сведения помогут лучше понять и, следовательно, контролировать процессы дифференцировки ЭСК, и тем самым, ускорят внедрение многообещающей технологии iPSC в практическую медицину.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 21-14-00369.

1. Stros M. 2010. HMGB proteins: Interactions with DNA and chromatin. *Biochim. et Biophys. Acta.* V. 1799. P. 101.
2. Reeves R. 2015. High mobility group (HMG) proteins, modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells. *DNA Repair.* V. 36. P. 122.
3. Starkova T, Polyanichko A, Tomilin AN, Chikhirzhina E. Structure and Functions of HMGB2 Protein. *Int J Mol Sci.* 2023 May 5;24(9):8334

УЧАСТИЕ МЕМБРАННО-СВЯЗАННОГО БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА mHSP70 В МИГРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Р.Б. Тагаева^{1*}, Н.Д. Аксёнов¹, Д.Е. Бобков¹, М.А. Шевцов^{1,2}

¹Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, 194064

²Школа медицины и наук о жизни, ДВФУ, г. Владивосток, 690922

* tagaeva97@yandex.ru

Белки теплового шока HSP70 представляют собой семейство высоко консервативных белков с молекулярной массой около 70 кДа. Одним из членов данного семейства является индуцибельная форма белка Hsp70 (HSPA1A), которая сверхэкспрессируется в опухолевых клетках различного происхождения и выполняет специфические функции, например, защищает опухолевые клетки от апоптоза, опосредует устойчивость к терапии, способствует пролиферации [1, 2]. Помимо внутриклеточной локализации белок присутствует на плазматической мембране высокоинвазивных клеток солидных и гематологических злокачественных новообразований, но не на мембране нормальных клеток [3].

В настоящем исследовании оценивали возможное участие мембранно-связанной формы белка Hsp70 (mHsp70) в миграции опухолевых клеток. С помощью методов конфокальной микроскопии и проточной цитометрии подтвердили, что используемые для работы клеточные линии глиомы крысы C6, глиобластомы человека T98G и U251 положительны по mHsp70. Каждая клеточная линия была отсортирована на две субпопуляции – с высокой (mHsp70^{High}) и низкой (mHsp70^{Low}) экспрессией белка, при этом для mHsp70^{High} средняя интенсивность флуоресценции была в 10 раз выше, чем для mHsp70^{Low}. Флуоресцентно-активированную сортировку клеток проводили с использованием S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США). Для полученных субпопуляций провели тест заживления раны, результаты которого показали, что субпопуляция mHsp70^{High} приводит к полному зарастанию раны за более короткий период времени по сравнению с mHsp70^{Low}. С помощью системы прижизненной микроскопии CellVoyager™ CQ1 (Yokogawa, Япония) оценили характеристики подвижности субпопуляций (среднюю скорость и извилистость треков). Съёмку клеток проводили в течение 24 часов с интервалом 15 минут. На полученных изображениях вручную покадрово отмечали треки движения клеток, после чего с помощью программного обеспечения R 4.0.2. вычисляли значения средней скорости и извилистости. Для клеток C6 и U251 субпопуляции mHsp70^{High} характеризовались большей скоростью движения, чем mHsp70^{Low} – средняя медиана скорости для клеток C6 mHsp70^{High} составила 15,24 мкм/ч, для mHsp70^{Low} 14,03 мкм/ч, для U251 19,8 и 18,6 мкм/ч соответственно. Субпопуляции также отличались по извилистости треков движения – высокая экспрессия mHsp70 способствовала снижению извилистости по сравнению с низкой. Статистический анализ средней скорости и извилистости субпопуляций клеток T98G не выявил существенных различий. Результаты выполненной работы свидетельствуют о возможной зависимости миграционной активности клеток от представленности Hsp70 на мембране, однако для изучения механизмов данной функции белка требуется проведение дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы стратегического академического лидерства ДВФУ "ПРИОРИТЕТ-2030".

1. Calderwood SK, et al. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. Trends Biochem. Sci. 2006; 31:164-172. doi:10.1016/j.tibs.2006.01.006
2. Shevtsov M, Huile G, Multhoff G. Membrane heat shock protein 70: a theranostic target for cancer therapy. Phil. Trans. R. Soc. B. 2017;373:20160526. doi:10.1098/rstb.2016.0526
3. Shin BK, et al. Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function. J Biol Chem. 2003;278(9):7607-7616. doi:10.1074/jbc.M210455200

ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ КОБАЛЬТ-ХРОМОВЫХ СПЛАВОВ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ В ОПЫТАХ IN VITRO

Ю.И. Тарануха*, С.В. Надеждин

ОФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, 308015
taranuha-julia2014@yandex.ru

В настоящее время в медицине сплавы на основе кобальта и хрома (Co-Cr) все чаще стали использоваться для производства медицинских изделий для восстановления поврежденных структур в стоматологии, травматологии и ортопедии. Известно, что от биомедицинского металлического сплава требуются три качества: хорошая биосовместимость, высокая коррозионная стойкость и достаточная износостойкость. Фактором, оказывающим определяющее влияние на биосовместимость материала, является количество веществ, которые выделяются из материала в окружающую среду или входе непосредственного контакта в окружающие его ткани.

Цель исследования – определить наличие цитотоксичности у сплавов Co-Cr в ходе культивирования мезенхимных стволовых клеток с образцами металлов.

Цитотоксичность материалов оценивали методом прямого контакта в соответствии с ISO 10993-5-2011. В ходе экспериментов *in vitro* был исследован 21 вид сплава Co-Cr, по 6 образцов на каждую группу (в виде дисков диаметром 5 мм). Исследование выполнено на мезенхимных стволовых клетках (МСК) крысы, выделенных из красного костного мозга бедренной кости. Образцы сплавов Co-Cr помещали в лунки 96-луночного планшета (SPL Lifesciences, Корея) и добавляли 0.04×10^6 МСК в 300 мкл питательной среды DMEM/F-12 (ООО «ПанЭко», РФ) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки, глутамином и антибиотиками. МСК культивировали в условиях инкубатора (влажность 95%, температура 37°C, 5% CO₂) в течение 72 часов. Для количественной оценки цитотоксичности в лунки 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл 5%-ного реагента WST-1 (Roche, Германия) и инкубировали 2 часа. По окончании времени инкубации 100 мкл супернатанта переносили в лунки нового 96-луночного планшета. Оптическую плотность растворов измеряли с помощью фотометра (Multiskan FC, фирма Thermo Scientific, США). Качественную оценку цитотоксичности проводили на микроскопе Eclipse Ti-S (фирма Nikon, Япония). Результаты обработаны с использованием программного обеспечения Statistica 10.

В ходе количественной и качественной оценки цитотоксичности сплавов металлов были установлены образцы, обладающие цитотоксичностью: №6 (59Co 25Cr 10W 4Mo 1Si 0.8Mn 0.2C), №8 (63.5Co 30Cr 5Mo 1Si 0.5C), №13 (64Co 29Cr 5Mo 1Mn 1C), №15 (40Co 20Cr 7Mo 17Fe 16Ni), №16 (65Co 29Cr 5Mo 1C), №17 (65Co 29Cr 6Mo) по сравнению с группой отрицательного контроля. МСК при культивировании с этими образцами имеют отклонения от нормальной фибробластноподобной морфологии, повсеместно в лунках встречался клеточный дебрис. В остальных экспериментальных группах МСК имеют типичную морфологию и представлены веретенообразными фибробластноподобными клетками, которые покрывают всю поверхность дна лунок 96-луночного планшета и контактируют с дисками металлических сплавов Co-Cr.

Таким образом, цитотоксическим эффектом обладают образцы в которых преобладают следующие элементы: №6 – 10W и 1 Si (wt%); №8 – 1Si (wt%), №13 – 1,0 C (wt%), №15 – 7Mo, 17 Fe, 16Ni (wt%), №16 – 1,0 C (wt%) и №17 – 6Mo (wt%). Наряду с этим необходимо отметить, что цитотоксический эффект может усиливаться за счет синергизма металлов, а также включения в состав сплава биологически активных металлов, например, Fe.

Исследование финансировалось Министерством науки и высшего образования Российской Федерации, проект № 20180167 «Разработка высокоэнтропийных сплавов для биомедицинского применения» в рамках программы «Приоритет-2030».

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБНОСТИ НУКЛЕОКАПСИДНЫХ БЕЛКОВ НИЗКО И ВЫСОКО ПАТОГЕННЫХ КОРОНАВИРУСОВ К ИНДУКЦИИ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ БИМОЛЕКУЛЯРНЫХ КОНДЕНСАТОВ

Тихомирова М.А.^{1*}, Кузьменко О.Л.², Арифудин Е.А.³, Мусинова Я.Р.^{1,3,4}, Шеваль Е.В.^{3,4}

¹ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334

² Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ, Москва, 119991

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ, 119992

⁴ Кафедра клеточной биологии и гистологии Биологического факультета МГУ, Москва, 119234

* mariiatikh@gmail.com

В настоящее время описано семь коронавирусов, инфицирующих человека. Четыре из них вызывают простудные заболевания, как правило не представляющие опасности для человека (низко патогенные коронавирусы - HCoV-229E, HCoV-NL63, HCoV-NKU1 и HCoV-OC43). Инфекция остальными тремя коронавирусами может приводить к развитию тяжелых респираторных заболеваний, представляющих угрозу для жизни пациентов (высоко патогенные коронавирусы - SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) Нуклеокапсидный белок отвечает за упаковку вирусной геномной РНК. По данным литературы его структура имеет четкие различия между группами низко и высоко патогенных коронавирусов, т.е. может определять различия в их патогенности. Нуклеокапсидные белки способны взаимодействовать с компонентами клетки, меняя как структуру инфицированных клеток, так и особенности их физиологии. Однако в литературе отсутствуют данные о специфике таких реакций у разных коронавирусов. Мы провели сравнительный анализ способности нуклеокапсидных белков всех известных коронавирусов человека влиять на аппарат трансляции клетки. При экспрессии нуклеокапсидных белков коронавирусов в клетках HeLa в цитоплазме некоторых клеток могут формироваться биомолекулярные конденсаты, образованные вирусными белками. Такие цитоплазматические конденсаты наблюдаются через 24 часа после трансфекции и практически полностью исчезают через 48 часов после трансфекции. Данные прижизненных наблюдений биомолекулярных конденсатов на флуоресцентном микроскопе в течение 16 часов свидетельствуют о том, что со временем клетка с конденсатами либо погибает, либо конденсаты разбираются, а их материал диффузно распределяется по цитоплазме. С наибольшей частотой конденсаты формируются при экспрессии нуклеокапсидных белков HCoV-229E, HCoV-NKU-1, HCoV-NL63, HCoV-OC43 и MERS-CoV. В случае нуклеокапсидных белков SARS-CoV и SARS-CoV-2 формирование конденсатов наблюдается не всегда и в незначительной части клеток. Формирование конденсатов не является следствием гиперэкспрессии белков, что противоречит опубликованным для нуклеокапсидного белка SARS-CoV-2 данным. По ультраструктуре и составу конденсаты сходны со стресс-гранулами. Таким образом, полученные данные говорят о том, что экспрессия нуклеокапсидных белков может вызывать стресс, который приводит к индукции формирования стресс-гранул. Причем, нуклеокапсидные белки SARS-CoV и SARS-CoV-2 демонстрируют пониженную способность индуцировать формирование цитоплазматических конденсатов.

Работа поддержана Российским научным фондом (проект 21-74-20134).

ОНКОГЕН-ИНДУЦИРОВАННОЕ СТАРЕНИЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК КОНТРОЛИРУЕТСЯ СИГНАЛАМИ ERK, АКТ, P53 И P38

А. Л. Торопов^{1*}, П. И. Дерябин¹, А. В. Бородкина¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: toropov.01@bk.ru

Интенсивные процессы обновления в эндометриальной ткани создают предпосылки для быстрого накопления мутаций в онкогенах и, как следствие, повышают риски развития рака у женщин зрелого возраста. Эндометриальные стромальные клетки (эСК) обладают высоким пролиферативным статусом и играют ключевую роль в восстановлении эндометрия, однако стромальные опухоли эндометрия являются редким видом новообразований. Это поднимает вопрос о наличии у эСК противораковых защитных механизмов. Хорошо известным механизмом, подавляющим развитие опухолей, является преждевременное клеточное старение. Ранее мы установили, что сверхэкспрессия онкогена HRAS (G12V) вызывает блок пролиферации и развитие фенотипа клеточного старения у эСК. Тем не менее, специфика молекулярных механизмов онкоген-индуцированного старения эСК остается недостаточно изученной.

Целью работы являлось выявление основных молекулярных механизмов HRAS (G12V)-индуцированного старения эСК. Для сверхэкспрессии HRAS (G12V) использовалась регулируемая тетрациклином система экспрессии из двух лентивирусных векторов. Один из них содержал ген зеленого флуоресцентного белка GFP и ген, который кодирует белок Tet-repressor. При отсутствии тетрациклина этот белок подавлял экспрессию HRAS (G12V) со второго вектора, а при воздействии тетрациклина экспрессия HRAS (G12V) запускалась. Для определения активности сигнальных путей клетки анализировались с помощью методов иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции. Вклад в развитие старения белков АКТ, ERK1/2, p53 и p38 оценивался путем модуляции их активности с помощью селективных ингибиторов. Признаки клеточного старения устанавливались с применением методов проточной цитометрии и окрашивания на ассоциированную со старением β-галактозидазу (SA-β-Gal).

После индукции сверхэкспрессии HRAS (G12V) в эСК мы наблюдали первичный гиперпролиферативный ответ клеток, который сопровождался повышением фосфорилирования нижележащих мишеней HRAS - АКТ и ERK1/2. Вслед за этим наблюдалась активация ответа на повреждение ДНК, о чем свидетельствуют выявленные ядерные фокусы фосфорилированного гистона γH2AX. Дальнейший блок пролиферации индуцировался активацией p53/p21/Rb сигнального пути и стабилизировался активацией p38/p16/Rb пути. Частичное предотвращение развития фенотипа старения было достигнуто ингибированием белков АКТ и ERK1/2. Подавление активности АКТ, ERK1/2, p38 и p53 не приводило к восстановлению пролиферативного потенциала клеток.

Таким образом, блок пролиферации и фенотип клеточного старения эСК, сверхэкспрессирующих HRAS (G12V), контролируется несколькими сигнальными путями с участием АКТ, ERK1/2, p38 и p53. Блок клеточного цикла в данном случае является устойчивым признаком и, вероятно, поддерживается несколькими резервными механизмами.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10038).

МОДЕЛЬ БОЛЕЗНИ КРОНА НА КРУПНЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (СВИНЬЯХ).

Е.А. Фарафонтова¹, Э.Н. Федулова¹, С.Н. Саралов¹, О.В. Шумилова¹, Н.Ю. Широкова¹,
К.Н. Ильина¹, Ю.П. Рубцова¹, П.В. Перетягин¹, М.Н. Егорихина¹.

¹ФГОБУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, 603005

*ekaterina_farafontova@mail.ru

Болезнь Крона характеризуется хроническим, рецидивирующим воспалением желудочно-кишечного тракта. Патогенез заболевания до конца не ясен, предполагается, что для формирования заболевания имеет значение нарушение регуляции врожденной и адаптивной иммунной системы, генетические факторы и факторы окружающей среды. При существующей терапии остается значительная часть пациентов, у которых не удается достичь ремиссии, что требует разработки новых методов лечения.

В связи с ростом этой патологии, утяжелением течения болезни, а также увеличением числа пациентов, нуждающихся в хирургическом вмешательстве, встает вопрос о необходимости изучения альтернативных методов лечения заболевания. В связи с этим актуальным является создание экспериментальной модели болезни Крона для доклинических исследований. Для этих целей нами разработан метод формирования язвенных дефектов кишечной стенки, характерных для болезни Крона, с возможностью эндоскопического и морфологического наблюдения за процессом заживления на крупных лабораторных животных - свиньях.

Метод состоит из нескольких этапов: 1. под эндоскопическим контролем выбирают участок слизистой; 2. осуществляется захват слизистой при помощи эндоскопической петли на перистальтике; 3. выполняют отсечение и коагуляцию кишечной стенки глубиной до мышечного слоя в смешанном режиме электроэксцизии силой тока 5,0-6,0 А. Под действием тока формируют язвенные дефекты кишечной стенки, соответствующих по глубине (до мышечной стенки), наличию четких границ типичной картине язвенных дефектов кишечной стенки при болезни Крона.

Таким образом, формируются изолированные язвы с четкими краями, иногда подрывные, на неизменной слизистой оболочке. Для язв характерны морфологические признаки: наличие глубоких эрозивно-язвенных дефектов, распространяющихся на все слои кишечной стенки, присутствие в подслизистой основе выраженной воспалительной инфильтрации с обнаружением значительного числа полиморфноядерных лейкоцитов с их проникновением в мышечную пластинку и отсутствие бокаловидных клеток.

Наличие четких контуров дефектов в представленной модели облегчает возможность введения лекарственных средств и контроля их эффективности в процессе регенерации. Данная модель на крупных животных значительно расширяет границы внедрения новых методов лечения на доклинической стадии их разработки и, возможно, позволит повысить эффект терапии пациентов с болезнью Крона, тем самым снизить риск хирургического вмешательства.

Финансирование: Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках проекта «Приоритет-2030».

МЕХАНОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ КАЛЬЦИЙ-ПРОНИЦАЕМЫЕ КАНАЛЫ PIEZO1 В 3D КУЛЬТУРЕ ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

З.М. Хайруллина^{1*}, А.В. Сударикова¹, В.Ю. Васильева¹, М.А. Шорохова¹, Ю.А. Негуляев¹,
В.И. Чубинский-Надеждин¹

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 194064

*khairyllinaa@mail.ru

Мезенхимные стволовые клетки эндометрия (эМСК) человека являются перспективным объектом для применения в регенеративной медицине, благодаря их высокой пролиферативной активности, доступному и неинвазивному способу получения и отсутствию серьезных этических ограничений. 3D клеточные агрегаты (сфероиды) физиологически более приближены к условиям, наблюдаем *in vivo*, так как они наиболее точно имитируют адгезивные и механические свойства природного внеклеточного матрикса и реализует межклеточные взаимодействия [1]. Сфероиды, образованные из эМСК, терапевтически более эффективны, чем монослойная клеточная культура [2]. Регуляция важнейших биологических процессов, таких как миграция и клеточная подвижность, тесно связана с механочувствительными (МЧ) ионными каналами семейства Piezo, недавно идентифицированными нами в эМСК, культивируемых в традиционных (2D) условиях [3]. Однако роль, экспрессия и регуляторные механизмы МЧ каналов могут значительно различаться в 3D культурах, при этом данные о роли МЧ каналов Piezo в клетках при 3D культивировании в литературе отсутствуют.

В представленной работе с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания было выявлено присутствие Piezo1 в сфероидов, сформированных из эМСК по методу “висячей капли” (hanging drop, 72 часа). Селективная химическая активация каналов Piezo1 низкомолекулярным веществом Yoda1 (10 мкМ) была показана с помощью метода патч-кламп в плазматической мембране клеток сфероидов. Далее мы решили проверить, как влияет активность Piezo1 на 3D культуру клеток эМСК. Были проведены две серии экспериментов: в первой наблюдали процессы расползания клеток из сфероидов. Сформированные сфероиды высевали на планшеты и добавляли к ним 10 мкМ Yoda1. С помощью цейтраферной съемки мы обнаружили, что активация Piezo1 снижает скорость расползания клеток из сфероидов эМСК. Во второй серии опытов мы формировали сфероиды эМСК непосредственно в присутствии Yoda1 в висячих каплях. Процесс формирования сфероидов регистрировали каждые 24 часа с помощью прямого микроскопа, оборудованного цифровой фотокамерой. Формирование сфероидов в каплях подтверждается сохранением плотно упакованных структур контрольных и обработанных Yoda1 сфероидов при переносе на чашку Петри. Сфероиды, обработанные Yoda1, демонстрировали повышенную адгезивную способность, по сравнению с контрольными. Через 24 часа после переноса на адгезивную поверхность клетки из сфероидов, сформированных с Yoda1, также показали сниженную скорость расползания, по сравнению с контрольными (площадь сфероидов с клетками в контроле в 2-5 раз больше, чем у сформированных с Yoda1). Таким образом, мы показали, что МЧ каналы Piezo1 присутствуют в клетках сфероидов, образованных из эМСК, и активация Piezo1 агонистом Yoda1 играет регуляторную роль в процессе формирования 3D структур. *Работа поддержана грантом РФФ № 22-74-10037.*

1. Huyck, *et al.* The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *J. Assay Drug Dev Technol.* 2012;
2. Domnina, *et al.* Three-Dimensional Compaction Switches Stress Response Programs and Enhances Therapeutic Efficacy of Endometrial Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *J. Front Cell Dev Biol.* 2020;
3. Chubinskiy-Nadezhdin, *et al.* Store-Operated Ca²⁺ Entry Contributes to Piezo1-Induced Ca²⁺ Increase in Human Endometrial Stem Cells. *J. Mol Sci.* 2022.

АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *COL1A1*, *COL11A1*, *HAS2* И *VIM* В ФИБРОБЛАСТАХ ДОНОРОВ РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУПП

М.М. Юнусбаева¹, Е.А. Котелевская¹, А.В. Котова^{1,2}, Т.Л. Золина¹, О.В. Сувильникова¹, Н.И. Енукашвили^{1,2}, Е.М. Приходько¹

¹ Центр клеточных технологий «Покровский», Санкт-Петербург, 199106

² Институт Цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064

yunusbaeva@pokrovcell.ru

Одним из ключевых факторов, влияющих на состояние кожи и ее регенеративные способности, является индивидуальная генетически детерминированная способность организма поддерживать процесс обновления внеклеточного матрикса дермы, одними из основных компонентов которого являются коллагены (в частности, кодируемые генами *COL1A1*, *COL11A1*) и гиалуроновая кислота (синтезируемая с помощью продукта гена *HAS2* – гиалуронансинтазы 2). Однако донорские фибробласты различаются по уровню экспрессии этих генов.

Цель: Оценить уровень экспрессии *COL1A1*, *COL11A1*, *VIM*, *HAS2* в группах доноров различных возрастов с целью разработки системы контроля качества дермальных фибробластов для регенеративной медицины.

Материалы и методы: В работе использовалась РНК, изолированная из культур ранних пассажей фибробластов кожи 60 добровольцев в возрасте от 0 до 60 лет. В соответствии с возрастной периодизацией все участники исследования были разделены на 4 группы: «дети» (0-10 лет), «молодые взрослые» (20-39 лет), «взрослые» (40-59 лет) и «пожилые» (60 и старше). Забор биоптатов кожи, выделение и культивирование клеток, паспортизацию клеточных культур проводили согласно утвержденным протоколам центра клеточных технологий «Покровский». Уровень экспрессии генов *COL1A1*, *COL11A1*, *VIM*, *HAS2* оценивали при помощи количественной ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Продукты генов *COL1A1*, *COL11A1* и *HAS2* участвуют в формировании внеклеточного матрикса и поддержании тургора кожи, ген *VIM* кодирует белок цитоскелета фибробластов, участвующий в поддержании их биофизических свойств и подвижности. Ген *ACTB* (β -актин) использовался в качестве эталонного гена для анализа генов-мишеней. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией – Этические принципы Медицинские исследования с участием людей (2013). Исследование было одобрено комитетом по этике. Все пациенты подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Результаты: Проведенный нами анализ изменения относительных уровней экспрессии генов *COL1A1*, *COL11A1*, *VIM*, *HAS2* в фибробластах кожи позволил выявить два гена *COL1A1* и *VIM*, экспрессия которых в клетках кожи от пациентов разных возрастных групп четко коррелировала с возрастом. Так, нормализованные значения экспрессии гена *COL1A1* в фибробластах кожи детей были в 2,9 раза выше ($p < 0,05$), чем в клетках группы «взрослые» (40-59 лет) и в 4,5 выше, чем в группе «пожилые» ($p < 0,05$) (60 и старше). Сравнение относительных уровней экспрессии гена *COL1A1* между группами «дети» и «молодые взрослые» (20-39 лет) не выявило статистически значимых различий, несмотря на наблюдаемую тенденцию к снижению экспрессии гена *COL1A1* в группе «молодые взрослые». Нормализованные значения экспрессии гена *VIM* были также высокими в фибробластах детской группы (среднее значение экспрессии составило $3,82 \pm 0,04$), тогда как клетки из группы «пожилые» демонстрировали самый низкий уровень экспрессии виментина ($1,67 \pm 0,02$, $p < 0,05$). Экспрессия гена *VIM* в фибробластах из групп «молодые взрослые» и «взрослые» занимала промежуточное значение $2,33 \pm 0,01$ и $2,10 \pm 0,07$, соответственно ($p > 0,05$).

Выводы: Полученные результаты анализа уровня экспрессии генов *COL1A1* и *VIM* показали наличие зависимости уровня экспрессии от возраста доноров. Количество синтезируемого коллагена I и виментина напрямую влияет на эффективность регенеративной терапии, поэтому оценка уровня экспрессии генов может использоваться для оценки ее эффективности и прогноза результата.

ПРИМЕНЕНИЕ МСК, ИНКУБИРОВАННЫХ С ЛПС, В МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ФОТОДИНАМИЧЕСКИ-ИНДУЦИРОВАННОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МОЗГА

Э.И. Якупова^{1,*}, В.А. Бабенко^{1,2}, А.Д. Бочарников³, Д.Н.Силачев^{1,2}, Плотников Е.Ю^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234

² Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии им. акад. В.И. Кулакова Минздрава РФ, Москва, 117198

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, 119192

*yakupova.mira@mail.ru

Инсульт представляет собой наиболее распространенное цереброваскулярное заболевание, которое вызывает серьезное нарушение неврологических функций и является основной причиной смертности во всем мире [1]. К настоящему времени методы лечения инсульта ограничены, и необходимо продолжать поиски нейропротекторных подходов. За последние десятилетия терапия на основе мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток (МСК) стала новой стратегией лечения различных заболеваний, включая инсульт, благодаря их уникальным свойствам, которые включают легкий способ получения, потенциал мультипотентной дифференцировки и высокую паракринную активность [2]. Показано, что инкубация МСК с ЛПС или их сокультивирование с лейкоцитами влияет на продукцию ими цитокинов IL-1a, IL-6, TNFa, металлопротеиназ MMP-2 и MMP-9, формируя воспалительный фенотип клеток [3]. В модели черепно-мозговой травмы приобретение МСК воспалительного фенотипа не только не приводило к снижению их терапевтической эффективности, но и позволяло им эффективнее снижать объем повреждения головного мозга и проявлять более выраженную нейропротекцию [4].

В настоящей работе мы провели исследование влияния МСК, инкубированных 24 часа с 10 нг/мл ЛПС в модели ишемического фотодинамически-индуцированного повреждения мозга/инсульта у крыс. При этом однократное внутривенное введение необработанных клеток в дозе 3 млн/кг через сутки после повреждения мозга у крыс не приводило к изменению объема повреждения по данным МРТ, но на 14 сутки после применения терапии у животных с введенными МСК наблюдалось снижение неврологического дефицита в тесте «постановки конечности на опору». У крыс в группе МСК+ЛПС наблюдалось увеличение неврологического дефицита, в сравнении с группой животных, которым вводились МСК без инкубирования с ЛПС. Таким образом, в модели ишемического инсульта мы не наблюдали увеличения нейропротекторных свойств МСК с воспалительным фенотипом, а даже обнаружили снижение их терапевтической эффективности.

Работа поддержана грантом РФФИ 20-54-56028.

1. Go ASM, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2013 update: A Report From the american heart association. *Circulation*. 2013;127(1):143–152.
2. Li W, et al. Mesenchymal stem cell-based therapy for stroke: current understanding and challenges. *Front cell neurosci*. 2021;15:628940.
3. Plotnikov E, et al. Influence of inflammation on MMSC: anti-inflammatory priming or switching to inflammatory phenotype. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018;33(1):i59–i60
4. Данилина ТИ, и др. Влияние провоспалительных факторов на нейропротективную эффективность мультипотентных мезенхимных стромальных клеток при черепно-мозговой травме. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2017, 2.

СТРОМАЛЬНО-ВАСКУЛЯРНАЯ ФРАКЦИЯ: ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА МЕТОДОМ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Г.С. Яцемирский^{1*}, Э.К. Дерий^{2**}, Е.М. Приходько¹, Н.И. Енукашвили¹, Д.В. Костяков²,
Е.В. Зиновьев², С.Н. Пятаков³, С.Н. Пятакова³

1. Центр клеточных технологий «Покровский»
2. Институт скорой помощи им. И.И. Джанелидзе
3. ГБУЗ «Городская больница №4», Сочи

* yatsemirsky@pokrovcell.ru

** derii.eduard@gmail.com

Стромально-васкулярная фракция (СВФ) жировой ткани – минимально манипулированный клеточный продукт, представляющий собой гетерогенную клеточную популяцию, состоящую из стромальных/стволовых клеток, эндотелиальных, гладкомышечных клеток, фибробластов, иммунных клеток и др., отделенных от адипоцитов с помощью различных методов (например, сочетания различных методов центрифугирования). Все эти компоненты вносят свой вклад в терапевтический эффект, наблюдаемый при применении СВФ. Однако данные о клеточном составе фракции противоречивы и, по всей вероятности, зависят от большого количества факторов (индивидуальные особенности пациента, протокол получения СВФ и анализа клеточного состава, место забора жировой ткани). Считается, что основным клеточным элементом, обуславливающим терапевтический эффект СВФ являются мезенхимные стромальные клетки (МСК).

Цель работы: методом проточной цитометрии определить клеточный состав, в частности, процентное содержание МСК, в препаратах СВФ, в зависимости от разных режимов центрифугирования и места забора

Материалы и методы: СВФ выделяли из липоасpirата, полученного во время липосакции по эстетическим показаниям у пациентки 26 лет (что соответствует молодому возрасту по классификации ВОЗ от 2012 года) с области передней брюшной стенки, внутренних поверхностей бедер и спины. При заборе всех образцов пациентка была проинформирована о процедуре и было подписано дополнительное письменное согласие. Липоасpirаты центрифугировали и осадок фильтровали через фильтры 100 мкм. Далее лизировали эритроциты и инкубировали клетки с одним из наборов флуоресцентно меченых антител и красителем йодистый пропидий (для определения жизнеспособности): Набор антител 1 (определение МСК и клеток эндотелия): CD44 FITC, CD73 PE, CD90 PC5, CD105 PC7, CD31 StarBV-570, CD14 APC-E780; набор антител 2 (определение лейкоцитов в целом и гемопоэтических предшественников): CD45 FITC, CD90 PC5, CD34 PC7.

Результаты: Во всех образцах, полученных из трех разных участков тела (бедро, спина, живот), количество МСК не превышает 1% (среднее – 0.5 ± 0.4 %), основную часть популяции составляют ядросодержащие клетки гемопоэтического происхождения, в основном, лимфоциты. В образцах СВФ, полученных при липосакции бедра, выявлено максимальное количество эндотелиоцитов и ранних гемопоэтических предшественников по сравнению с другими образцами. Следует отметить высокое суммарное содержание CD31+ клеток – 82.5% в СВФ бедра, 70% в СВФ спины, 83.3% в СВФ живота. К ним относятся различные популяции лейкоцитов, а также циркулирующие эндотелиоциты (предшественники эндотелиоцитов сосудов). Следует отметить, что при использовании менее развернутых иначе скомбинированных панелей, легко получить искаженную картину процентного содержания МСК. Так, например, возможно принять CD34+/CD90+ /CD44+ гемопоэтические и эндотелиальные предшественники за МСК

Выводы: Терапевтический эффект от применения СВФ, в частности, для ускорения эпителизации ожоговых ран, обусловлен, скорее всего, не МСК, а эндотелиоцитами и клетками гемопоэтического происхождения – преимущественно гемопоэтическими предшественниками и лимфоцитами. Эндотелиоциты (в том числе, и CD117+ положительные – обеспечивающие рост капилляров), скорее всего, влияют на процессы ревазуляризации ткани. Высокое содержание CD31+ лейкоцитов (в частности, лимфоцитов) в СВФ также способствует ускорению регенерации ткани.



РОССИЙСКАЯ КОЛЛЕКЦИЯ ТИПОВЫХ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР (РКТКК)

Российская коллекция типовых клеточных культур – это сетевое объединение фондов коллекций клеточных культур человека и животных. В основе работы строгие требования к качеству, набору характеристик, условиям хранения и распространения клеточных линий.

Задачи РКТКК:

Объединение фондов коллекций-участников РКТКК на базе единой информационной платформы - cellcollection.ru ;

Обеспечение удобного поиска паспортизованных клеточных линий, формирование заказа на выдачу образцов и его отслеживание;

Внедрение строгих стандартов качества коллекционных клеточных линий и контроль их соответствия;

Консультации и обучение пользователей.

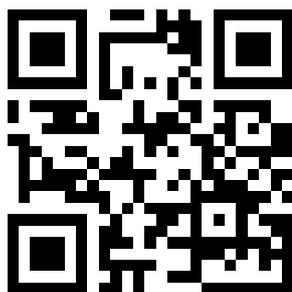
Расширение коллекционных фондов за счет включения авторских клеточных линий и вхождения в состав РКТКК новых коллекций -участников.

Вступление в РКТКК будет возможно с 2024 г.

Участники РКТКК:



**ЦЕНТР КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
«ПОКРОВСКИЙ»**





Коллекция клеточных культур для научных и биотехнологических исследований Центра клеточных технологий «Покровский»

Коллекция начала создаваться в 2007 г. Изначально в её основу был положен гибридный принцип организации биобанкирования - в банке сохраняются как частные образцы, так и культуры, полученные из донорского материала для научных и биотехнологических исследований. Образцы получены в соответствии с существующим законодательством, регламентирующим забор материала для культивирования.

В настоящий момент в коллекции представлено

- 150 культур мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (мМСК) пупочного канатика (регистровое общественное хранение)
- 24 культуры мМСК жировой ткани
- 14 культур мМСК костного мозга
- 4 культуры эндотелия вены пупочного канатика (HUVEC)
- 15 культур дермальных фибробластов
- 2 культуры ворсинок хориона
- 2 культуры мМСК эндометрия
- 2 культуры мМСК печени
- Свыше 4000 образцов мононуклеарной фракции пуповинной крови доноров (образцы генотипированы на наличие мутации CCR5D32 в гене CCR5)

В коллекции также представлены "парные" культуры - **культуры различного тканевого происхождения от одного и того же донора**. К ним относятся:

- Стволовые клетки пульпы, периодонта и апикального фолликула мМСК жировой ткани и хондроциты
- дермальные фибробласты и мМСК жировой ткани

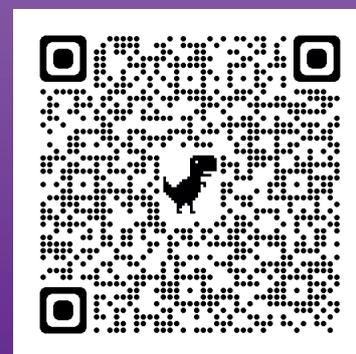
Культуры паспортизованы. Паспорт включает в себя:

- Верификацию отсутствия
 - антител и антигенов вирусов ВИЧ1, 2, гепатита В и С.
 - Контаминации микоплазмами (16 видов)
 - Бактериальной и грибковой контаминации (по ОФС.1.2.4.0003.15

Стерильность)

- Генетический профиль (26 STR маркеров - COrDIS EXPERT 26)
- Кариотип
- Результаты иммунофенотипирования
- Результаты оценки функциональной активности
- Данные о жизнеспособности перед криоконсервацией
- Рекомендуемые условия культивирования и криоконсервации

Коллекция Банка входит в сетевое объединение фондов коллекций клеточных культур человека и животных: Российскую коллекцию типовых клеточных культур



STEMCELLBIO-2023

ТРАНСЛЯЦИОННАЯ МЕДИЦИНА – СПЕКТР ВОЗМОЖНОСТЕЙ

Сборник материалов конференции
и Школы-конференции «Коллекции культур
клеток человека и животных: современные вызовы
и сетевые решения»

Подписано в печать 27.10.2023. Формат 60×84/8. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 17,75. Тираж 250. Заказ 4927.

Отпечатано с готового оригинал-макета, предоставленного редколлегией,
в Издательско-полиграфическом центре Политехнического университета.
195251, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 29.
Тел.: (812) 552-77-17; 550-40-14.

SARTORIUS



ПУЩИНСКИЕ
ЛАБОРАТОРИИ



