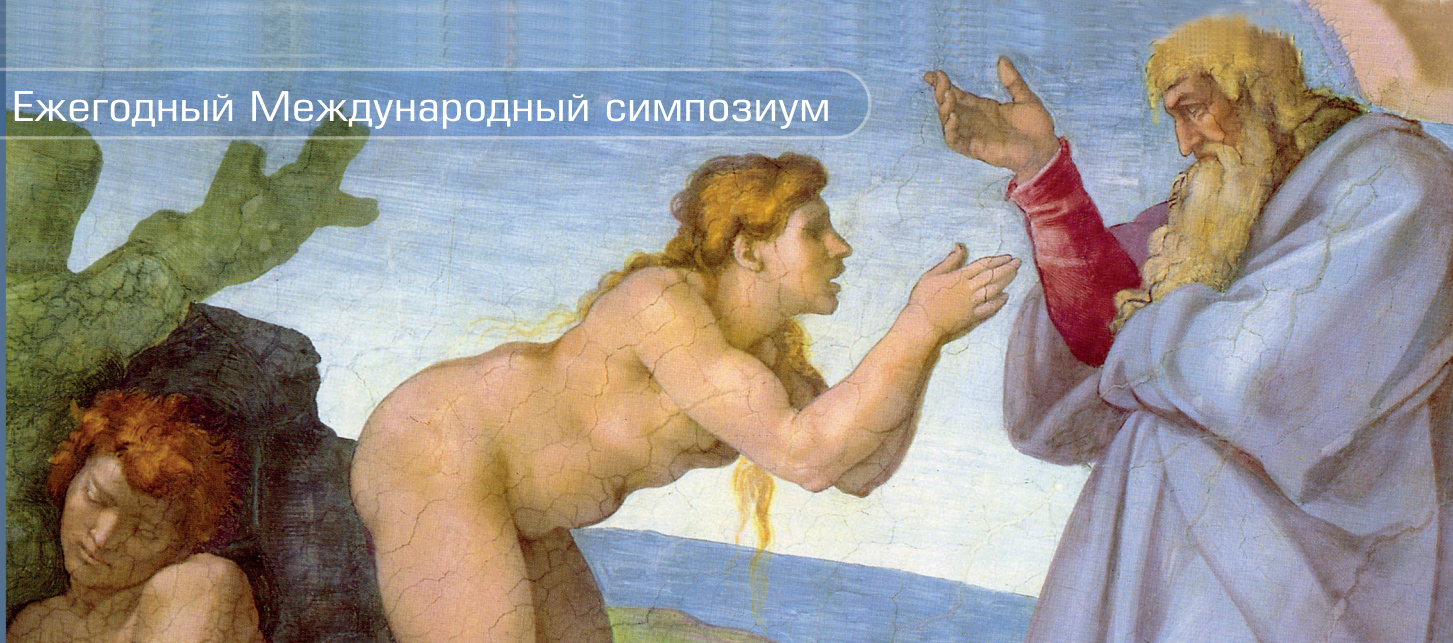




V Ежегодный Международный Симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»

Москва, 28 мая 2012 г.

Тезисы докладов

Б.В. Афанасьев

Опыт лечения наследственных заболеваний с помощью трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, перспективы использования генной терапии

*Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачёвой
Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
Санкт-Петербург, Россия*

B.V. Afanasiev

The experience of treatment of hereditary diseases by hematopoietic stem cells transplantation.

The prospects of gene therapy

Raisa Gorbachev Institute of Children's Hematology and Transplantation Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russia

Наследственные генные болезни представляют собой большую группу заболеваний, характеризующихся различным типом наследования, возрастом манифестации (от младенческого до взрослого), прогрессирующим течением, вовлечением разных органов и систем, и, вследствие этого, широким спектром клинических проявлений. Частота большинства наследственных болезней низкая, однако суммарно эти состояния весьма заметны в популяции: в среднем, частота заболеваний составляет ~ 1: 10 000–12 000 новорожденных.

За последние 20 лет в терапии наследственных заболеваний сделаны значительные успехи: заместительная терапия, энзимотерапия, генно-инженерные методы, аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК). Недостатками заместительной терапии является необходимость

пожизненного назначения, возникновение аллергических реакций, выработка антител к лекарственным препаратам, отсутствие предотвращения развития изменений со стороны нервной системы.

Одним из наиболее эффективных методов лечения ряда врожденных и наследственных заболеваний у детей, протекающих с поражением кроветворной и иммунной систем, является алло-ТГСК, при этом более чем у 80% пациентов удается достичь полного излечения, причем, в отличие от онкологических заболеваний, отсутствует риск развития рецидива. На эффективность алло-ТГСК при генетических заболеваниях влияет стадия и выраженность клинических проявлений. Таким образом, своевременно поставленный диагноз позволяет провести алло-ТГСК в сроки до появления необратимых изменений. Однако, данный метод лечения может быть применим только для около 40 нозологических форм, таких как: первичные иммунодефициты, болезни накопления, врожденные синдромы костномозговой недостаточности, гемоглобинопатии, гистиоцитозы.

С 01.2005 по 04.2012 гг. в ИДГиТ им. Р.М. Горбачёвой СПбГМУ выполнено 15 алло-ТГСК от неродственного донора у детей со следующими наследственными болезнями: синдром Костманна, синдром Вискотта-Олдрича, анемия Фанкони, анемия Блекфана-Даймонда, метахроматическая лейкодистрофия, болезнь Краббе, остеопетроз, X-сцепленная адренолейкодистрофия, синдром Гурлера, синдром Швахмана-Даймонда, тяжелый комбинированный иммунодефицит. Общая 3-летняя выживаемость пациентов составила 72%, при оценке эффективности алло-ТГСК наблюдали стабилизацию, улучшение или полное излечения от заболевания. Основными осложнениями были инфекции, реакция «трансплантат против хозяина», токсичность, связанная с режимом кондиционирования.

Генная терапия — метод лечения, активно разрабатываемый для некоторых нозологических форм иммунодефицитных состояний, болезней накопления, синдромов врожденной костномозговой недостаточности. Преимуществами данной терапии являются отсутствие токсических осложнений, реакции «трансплантат против хозяина», которые развиваются после алло-ТГСК. Неразрешенными вопросами при применении генной терапии являются риск развития острого лейкоза вследствие инсерционного мутагенеза, недостаточный и нестойкий эффект, вероятность развития инфекционных осложнений, связанных с возможностью репликации вируса.

Н.В. Барышникова

Скрининг как эффективный метод профилактики наследственной патологии

Российский Национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, России

N.V. Barischnikova

Screening as an effective method of preventing hereditary diseases

Pirogov Russian State Medical University, Moscow, Russia

Наследственная и врожденная патология занимает значительное место в структуре заболеваемости и смертности населения. Это обуславливает необходимость разработки профилактических мероприятий.

Существует два подхода к профилактике наследственной патологии: семейная профилактика через медико-генетическое консультирование и популяционная профилактика, базирующаяся на специальных программах скрининга (Козлова С.И., Ижевская В.Л., 2005). Оба подхода взаимосвязаны, а эффективность каждого определяется образовательным уровнем как врачей, так и населения, и настороженностью по поводу возникновения наследственной патологии в отдельно взятой семье.

Программы скрининга (*screening* (англ.) — просеивание) направлены на выявление лиц с патологическими генотипами на доклинической стадии для предотвращения развития симптомов и коррекции осложнений заболевания (неонатальный биохимический скрининг, аудиологический скрининг новорожденных), формирование групп риска и предоставление возможности проведения пренатальной диагностики (молекулярно-генетический скрининг гетерозигот, скрининг беременных).

В зависимости от обследуемого контингента выделяют массовые, селективные и региональные программы скрининга. Массовые программы скрининга подразумевают обследование здорового населения. Концепция обследования здоровой популяции получила развитие с середины XX столетия и зарекомендовала себя как эффективный метод раннего выявления болезни до манифестации клинических проявлений. Многочисленные исследования, проведенные в разных странах (Долгов И.И. и др., 2002; Малиевский О.А. и др., 2006; Laberge J., 1983; Hannon H., Therrell B., 1991), показали, что по затратам на просеивающие программы и экономической эффективности от их применения (сохранение здоровья леченых индивидов) указанные программы

дают государству 5–10-кратную экономическую выгоду (Матулевич С.А., 2009).

Скрининг новорожденных на наличие частых наследственных заболеваний (фенилкетонурию, муковисцидоз, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром и галактоземию), а также скрининг беременных женщин на наличие пороков развития плода и частых хромосомных синдромов являются примерами успешных массовых программ как в мировой практике, так и в России (Приложение №1 к Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 22 марта 2006 г. № 185; Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 28.12.2000 № 457. О совершенствовании пренатальной диагностики в профилактике наследственных и врожденных заболеваний у детей).

Действующие программы скрининга традиционно используют широкий спектр современных лабораторных (биохимических, иммунологических, цитологических) и инструментальных методов (УЗИ-диагностика и др.). Однако наибольшая эффективность программ скрининга обеспечивается комплексным и последовательным использованием нескольких диагностических методов, а также при тесном взаимодействии и преемственности в работе врачей различных специальностей.

Например, точность диагностики нарушений слуха при аудиологическом обследовании новорожденных составляет 96% при использовании алгоритма, включающего следующий ряд последовательных мероприятий: регистрация и анализ вызванной отоакустической эмиссии, наружная отоскопия, тимпанометрия, консультация ЛОР врача, консультация сурдолога, подтверждение диагноза в специализированном сурдологическом центре (Пономарева Л.П., Ширина Н.С., 2008). Успех скринирующих программ на раннюю диагностику нарушений слуха в значительной мере определяется наличием тесного взаимодействия и преемственности в работе неонатолога, детского отоларинголога и сурдолога. Кроме того, учитывая, что более 50% всех случаев врожденной и ранней детской тугоухости связано с наследственными причинами, необходимо медико-генетическое консультирование семей, имеющих ребёнка с тугоухостью.

Программа скрининга беременных женщин на наличие пороков развития плода и частых хромосомных синдромов проводится в I и II триместрах и включает анализ биохимических маркеров в крови беременной и УЗИ плода, медико-генетическое консультирование беременных из группы риска, а при необходимости и специальные генетические методы. Успех данной программы обусловлен взаимодействием акушеров-гинекологов, врачей-лаборантов и врачей-генетиков.

Скрининг новорожденных на наличие частых наследственных заболеваний (фенилкетонурию, муковисцидоз, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром и галактоземию) также включает ряд последовательных мероприятий: 1) взятие биологического материала для исследования и доставка материала в диагностическую лабораторию; 2) лабораторная просеивающая диагностика; 3) уточняющая (подтверждающая) диагностика всех случаев с положительными результатами при просеивании; 4) лечение больных и их диспансеризация с контролем

за ходом лечения, 5) медико-генетическое консультирование семьи. Успех данных программ зависит от взаимодействия неонатолога, педиатра, генетика, эндокринолога (в случае врождённого гипотиреоза и андрогенитального синдрома).

Таким образом, программы скрининга являются многоэтапными и требуют на последнем этапе цитогенетического и (или) молекулярно-генетического подтверждения диагноза для установления генетического варианта заболевания и проведения эффективного медико-генетического консультирования отягощённых семей.

Существующие программы скрининга являются основой вторичной профилактики. Однако наиболее перспективной является первичная профилактика, направленная на предотвращение рождения ребёнка с наследственной патологией. Основой первичной профилактики является медико-генетическое консультирование, для наибольшей эффективности которого необходима информация о генетическом статусе консультирующихся. Следовательно, необходима разработка ещё одного направления обследования здоровых людей и (или) новорождённых — молекулярно-генетического скрининга, позволяющего с высокой точностью установить генотип обследуемого. Обнаружение мутаций, ассоциированных с заболеванием, в гомозиготном и компаунд-гетерозиготном состоянии позволит прогнозировать развитие и тяжесть течения наследственно обусловленной патологии до клинической манифестации болезни и, дополняя существующие программы неонатального скрининга, сократит сроки постановки диагноза и позволит раньше начать лечение. Идентификация гетерозиготного носительства патологических мутаций в гене, которое, как правило, не проявляется клинически, но даёт высокий риск иметь пораженное потомство, позволит своевременно оценить генетический риск, планировать деторождение и исключить возникновение новых случаев заболевания в семье. Это приведёт к осознанности и, соответственно, большей эффективности первичной профилактики, основанной на медико-генетическом консультировании.

Таким образом, скрининг является одним из эффективных методов профилактики наследственной патологии.

П. Буржуа

NMD-чип: европейский проект диагностики нервно-мышечных заболеваний на основе технологии ДНК-чипирования

NMD-Chip project, Marsel, France

Целью проекта по созданию NMD-чипов, организованного французской ассоциацией по лечению миопатий и несколькими европейскими диагностическими лабораториями, являлись разработка, развитие и проверка нового высокочувствительного ДНК-диагностического набора с высокой пропускной способностью для эффективной диагностики нервно-мышечных заболеваний (НМЗ). Всё специальное оборудование разработано как для оценки всех известных генов, которые предположительно одновременно участвуют в возникновении НМЗ, так и для эффективного анализа данных через оптимизированные биоинформатические приборы в промежутке от 72 часов до одной недели.

Помимо развития новых диагностических молекулярных приборов с высокой пропускной способностью NMD-чип также способствует накоплению знаний о нервно-мышечной патологии путём значительного сокращения времени на открытие новых заболеваний, вызванных мутациями, используя подходящие для каждого данного случая гены.

P. Bourgeois

NMD-Chip: a European project dedicated to Neuro-Muscular Disorders diagnostic through DNA chip technologies

NMD-Chip project, Marsel, France

The aim of NMD-Chip project, initiated by French Association against Myopathy (AFM) and several European diagnostic laboratories, was to design, develop and validate new sensitive high throughput DNA arrays to efficiently diagnose patients affected by NMDs. The tools originating from this project are designed to assess all known genes implied in a group of disease at one time, as well as to efficiently analyze chip data through optimized read-out bioinformatics tools, within 72hrs to one week. Beside the development of these new high throughput molecular diagnostics tools, NMD-Chip also fosters the knowledge of NMDs by accelerating new disease causing mutations discovery, using a candidate gene approach.

Indeed, the scientific strategy was to design 4 types of chips, 2 for known NMD genes testing, and 2 for candidate genes exploration. In each case, both CGH arrays to detect CNV (insertions or deletions), as well as Sequence Capture arrays for massive re-sequencing and point mutation detection, have been set up.

The two first generations of CGH NMD-chips including all the known genes have been validated on different previously characterized DNA with several deletions or insertions in LAMA2, DYSF, CAPN, DMD, PMP22, COL6A genes and others. Several so far uncharacterized patients have been provided with a molecular diagnosis, and results obtained by different partners will be shown.

For the research part of the project (candidate gene exploration), the CGH chips have been designed and validated too. One partner has explored a cohort of 33 patients with an uncharacterized LGMD, with at the moment one new CNV candidate being further analyzed. As regards the DNA captures, different approaches have been initialized, combining the commercial options (exome) with dedicated probes, from different providers. Several examples will be illustrated of our first sequencing results. From a bio-informatics point of view, several tools have been created to improve the chip design, to collect all the data, to analyze the pathogenicity of the mutations detected by the chips. In order to quickly assess the pathogenicity of any SNP localized within an exon, the UMD-HTS system has been set-up. Finally, the NGS-Viewer constitutes a complete pipeline to analyze NMD sequencing data from the raw data coming out of the sequencer to the final report that can be saved and exported to databases.

Е.Л. Дадали

Классификация, особенности клинических проявлений и способы диагностики и профилактики наследственных заболеваний

Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва, Россия

E.L. Dadali

Classification, clinical manifestations and features of diagnostic methods and prevention of hereditary diseases

Medical Genetics Research Center RAMS, Moscow, Russia

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают наследственные заболевания. Несмотря на то, что их доля в структуре общей заболеваемости составляет 5% показано, что 40–50% перинатальной детской смертности и инвалидности с детства обусловлены наследственными факторами и 30% коек в детских стационарах заняты больными с наследственной патологией. Известно, что наследственные заболевания характеризуются прогрессирующим течением, высоким повторным риском возникновения в отягощенных семьях и для большинства из них отсутствует эффективное лечение. В соответствии с принятой в настоящее время систематикой выделяют четыре основные группы наследственных заболеваний: хромосомные синдромы, моногенные заболевания, мультифакториальные заболевания и болезни соматических клеток (опухоли). Основную группу хромосомных синдромов составляют трисомии по 13, 18 и 21 хромосомам, на долю которых приходится около 95% всех хромосомных синдромов. Именно эти наследственные болезни диагностируются при помощи скрининга, проводимого в первом и втором триместрах беременности на основе изучения концентрации хорионического гонадотропина и альфа-фетопротеина в крови беременных женщин, а также выявления УЗИ маркеров у плода. Однако дородовая диагностика моногенных заболеваний, распространенность которых вдвое превышает частоту хромосомных синдромов, в настоящее время не проводится. Известно, что моногенные заболевания могут наследоваться по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному, X-сцепленному доминантному, X-сцепленному рецессивному, голландрическому и митохондриальному типам.

К настоящему времени в международном каталоге OMIM изложена информация о более 5000 моногенных заболеваний. Для большинства этих заболеваний идентифицированы и (или) картированы гены на определенной хромосоме, следовательно, для них возможна профилактика на основе проведения дородовой диагностики, предотвращающей рождение больного ребенка. Среди консультирующихся в том числе женщин, обращающихся для проведения скрининга беременных, бытуют представления о том, что появление наследственной патологии у их детей возможно лишь в том случае, если один из супругов или их родственники страдают наследственной патологией. Но это не так. Например, появление у ребенка заболевания с аутосомно-рецессивным типом наследования с вероятностью 25% возможно

в случае гетерозиготного носительства здоровыми супругами мутаций в одном и том же гене. Известно, что существует, по крайней мере, пять распространенных аутосомно-рецессивных заболеваний, когда каждый 40 или даже 20 человек независимо от национальности является носителем мутаций в генах. К распространенным наследственным заболеваниям с аутосомно-рецессивным типом наследования относятся: проксимальная спинальная мышечная атрофия, муковисцидоз, фенилкетонурия, несиндромальная нейросенсорная тугоухость и болезнь Жильбера. Несмотря на то, что часть этих заболеваний диагностируется с помощью скрининга новорожденных с использованием биохимических тестов, их точная диагностика возможна только при проведении ДНК анализа, направленного на поиск мутаций в генах, ответственных за их возникновение. Кроме того, при проведении ДНК анализа можно определить не только наличие заболевания, но и определить носительство патологического гена у человека, что поможет избежать рождения им больного ребенка в будущем. Следовательно, проведение ДНК анализа, направленного на выявление гетерозиготного носительства мутаций в генах, приводящих к возникновению распространенных наследственных заболеваний целесообразно проводить всем супружеским парам, планирующим беременность. Обнаружение такого носительства позволит избежать рождения больного ребенка путем проведения дородовой диагностики на ранних сроках беременности.

Кроме того, показано существование значимых полиморфизмов некоторых генов, наличие которых формирует предрасположенность к возникновению заболевания, реализующуюся под действием факторов внешней среды. Одним из таких полиморфизмов является наличие двух аллелей C в 13910 положении гена LCT, продуктом которого является фермент лактаза, расщепляющая молочный сахар. Учитывая, что молоко является основной пищей грудного ребенка, наличие этого полиморфизма может привести к снижению активности фермента и возникновения процессов брожения в толстом кишечнике ребенка. Выявление этого полиморфизма позволит вовремя скорректировать недостаточную функцию фермента и избежать возможных осложнений.

Р.В. Деев¹, И.Я. Бозо¹, Н.М. Мжаванадзе²,
Е.Г. Нерсисян³, Ю.В. Червяков³, И.Н. Староверов³,
Р.Е. Калинин², С.Л. Киселев¹, А.А. Исаев¹

Первый в Европе геннотерапевтический препарат Неваскулген: от фундаментальных исследований к рутинной клинической практике

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва, Россия

² Рязанский государственный медицинский университет, Рязань, Россия

³ Ярославская государственная медицинская академия, Ярославль, Россия

Хроническая ишемия нижних конечностей (ХИНК) до сих пор является нерешенной проблемой современного здравоохранения. Ее распространенность среди населения старше 50 лет составляет 5–8%, а у людей с факторами риска (гиперлипидемия, курение, артериальная гипертензия или сахарный диабет) достигает 30%. Несмотря на широкие воз-

возможности хирургии, около 20–30% так и остаются «неоперабельными». Для такой группы больных арсенал терапевтических методов лечения может быть пополнен новым препаратом — Неоваскулген® (Институт стволовых клеток человека, Москва). Его эффект основан на принципе терапевтического ангиогенеза. Препарат представляет собой невирусную, сверхскрученную плазмидную ДНК, кодирующую человеческий фактор роста эндотелия сосудов (165 аминокислотных остатков).

В ходе 1-2а и 2б-3 фаз открытого рандомизированного клинического исследования принимали участие пациенты с облитерирующими заболеваниями артерий нижних конечностей атеросклеротического генеза IIa, IIб, III степенью ишемии по классификации А.В. Покровского-Фонтейна (клинические группы — 125 пациентов; группа контроля — 25). Препарат вводился двукратно внутримышечно, максимально близко к зоне ишемии, с интервалом в 2 недели.

Пациенты проходили лечение в трех клинических центрах (ГОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» (РязГМУ); ГУЗ «Ярославская Областная клиническая больница» (ЯОКБ); ФГУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского РАМН» (РНЦХ).

Оценку безопасности выполняли путем фиксации субъективных данных, регистрацией нежелательных и серьезных нежелательных явлений, а также определением клиничко-лабораторных показателей состояния здоровья пациента. Основным критерием эффективности определено изменение дистанции безболевой ходьбы (ДБХ), что является основополагающим элементом классификации ХИНК и относится к международным рекомендациям I класса доказательности. Этот показатель определялся при проведении тредмил-теста. Регистрировали и оценивали вторичные критерии эффективности, к которым отнесли: лодыжечно-плечевой индекс (ЛПИ); чрезкожно (транскутанно) определяемое парциальное давление (напряжение) кислорода (ТКНК, мм рт.ст.).

Установлено, что через 6 мес. после начала лечения увеличение ДБХ составило +149,47 м, со среднего значения 135,3±102,37 м до 284,7±242,02 м.; ЛПИ увеличился с 0,51±0,18 до 0,57±0,19; ТКНК увеличился с 76,69±9,96 мм. рт. ст. до 85,42±10,87 мм. рт. ст.

После окончания срока наблюдения, предусмотренного протоколом, контроль состояния пациентов был продолжен в течение еще 0,5 года. В ходе динамического наблюдения за пациентами этой группы получены статистически достоверные результаты об улучшении кровообращения в нижних конечностях по результатам измерения ДБХ, ЛПИ и ТКНК за первые 12 мес. ($p < 0,05$). Клиническое улучшение отмечено в 77,8% наблюдений. При этом большая часть пациентов (61,1%) по клиническим данным перешли в более легкую стадию заболевания — IIб, а 16,7% больных в стадию IIа.

Полученные данные позволяют сделать вывод об эффективности курса терапии препаратом (в составе комплексного лечения в течение ½ года и 1 года после применения). Отмечается выраженная положительная динамика в состоянии пациентов с IIа-IIб-III степенями ХИНК по основным выбранным критериям эффективности. Клиничко-лабораторные показатели, которые регулярно исследовались в те-

чение всего периода лечения и наблюдения за всеми пациентами, не выявили заметных отклонений от первоначальных значений. За весь период наблюдения не отмечено нежелательных и серьезных побочных явлений, связанных с использованием препарата, что свидетельствует о хорошей переносимости препарата Неовас-кулген®.

R.V. Deev¹, N.M. Dgavanadze², E.G. Nersesyan³,
U.V. Chervyakov³, I.N. Staroverov³, R.E. Kalinin²,
S.L. Kiselev¹, A.A. Isaev¹

The first genno-therapeutical drug in Europe Neovaskulgen: from basic research to routine clinical practice

¹ Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² Ryazan State Medical University, named by
academician I. P. Pavlov, Ryazan, Russia

³ Yaroslavl State Medical Academy, Yaroslavl,
Russia

Chronic ischemia of lower extremities (CILE) is still an unsolved problem in the structure of cardiovascular diseases. The prevalence is 5–8% among the population older than 50 years and reaches 30% for the population with risk factors (hyperlipidemia, smoking, arterial hypertension or diabetes mellitus). Despite opportunities of the Surgery about 20–30% cases remain inoperable. For this group of patients an arsenal of therapies can be replenished with a new drug — Neovaskulgen (Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia). Its effect is based on the principle of therapeutic angiogenesis. The product is a nonviral, supercoiled, plasmid DNA, encoding human vascular endothelial growth factor. Purpose of the work : improve treatment outcomes of patients with chronic ischemia of lower extremities. Patients with obliterating atherosclerotic diseases of lower extremities arteries with II-a, II-b, III degrees of ischemia (according to a classification of A. V. Pokrovsky — Fontein), participated in the first-second and second-b of the open randomized 1-2a and 2b-3 phases clinical trial (clinical groups — 125 patients ; control group — 25). The drug was administered intramuscularly as closely as possible to the area of ischemia twice at intervals of two weeks. Patients were treated in three clinical centers : Ryazan State Medical University; Yaroslavl Regional Hospital; Russian Scientific Center of Surgery. Safety assessment has been carried out by fixation of subjective data, registration of adverse events and serious adverse events, and also by definition of clinical and laboratory measures of health status. The changes in the distance of painless walking (DPW) were determined as the main criterion, thus it's a fundamental element of CILE- classification and refers to TASC-II of the first class of evidence. This figure was determined during the treadmill test. The effectiveness of secondary criteria was recorded and evaluated; they are: ankle-brachial index (ABI); percutaneously determined the partial pressure of oxygen (TCpO2). It was found that after 6 months of this treatment DPW increased to +149,47 m. from an average 135,3+/-102,37 m. to 284,7+/-242,02 m.; increased from 76,69 m+/-9,96, 85,42+/-10,87. Control of patients was continued for 6 months after the end of the observation period. During dynamic monitoring of patients of this group statistically significant results on the improvement of blood circulation in the low extremities in accordance

the DPW-, ABI- and TCpO2-results for the first year were obtained. Clinical improvement was observed in 77,8% of cases. The majority of patients (61,1%) moved to a lighter stage of the disease — Iib and 16,7% moved to II stage, according to the clinical data. The data allow to conclude about effectiveness of drug therapy. It's noted marked improvement in the condition of patients with Iia-Iib-III stages of CILE according to selected key performance criteria. Clinical and laboratory parameters, which were being studied during the entire period of treatment and monitoring of all patients, showed that there were no significant deviations from the original values. There weren't noted any adverse or serious adverse events associated with the using of the drug for the entire period of observation, indicating a good tolerability.

М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев

Клетки с индуцированной плюрипотентностью как модель нейродегенеративных заболеваний

Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

Технология получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) из соматических клеток взрослого организма впервые была предложена в 2006 г. ИПСК по многим своим свойствам сходны с самыми универсальными эмбриональными стволовыми клетками. Основными областями применения ИПСК являются регенеративная медицина и моделирование заболеваний человека. Особый интерес при моделировании различных патологий человека представляют нейродегенеративные заболевания, такие как болезнь Паркинсона, хорей Хантингтона, макулярная дегенерация и ряд других. Дифференцировка ИПСК в специализированные типы клеток представляет уникальную возможность для моделирования патологий, в связи с тем, что во взрослом организме нейрональные клетки имеют ограниченную доступность, а животные или существующие клеточные модели не являются адекватными.

В проведенном нами исследовании был получен ряд ИПСК от пациентов, носителей болезни Паркинсона, Хантингтона, наследственной макулодистрофии с помощью лентивирусной модификации фибробластов кожи генами транскрипционных факторов OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4. Клеточные линии были полностью охарактеризованы, включая плюрипотентность. Для каждого типа патологии были разработаны протоколы направленной дифференцировки ИПСК в специализированные нейрональные типы клеток.

М.А. Lagarkova, S.L. Kiselev

Induced pluripotent stem cells based model system for studying neurological disorders

Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

Discovered in 2006, induced pluripotent stem cells (iPSCs) have properties similar to embryonic stem cells (ESCs) and can be derived from somatic cells of the adult organism. Two major areas of practical application of iPSCs technology are regenerative medicine and human diseases modeling. Particular interest for modeling diseases with iPSCs represents neurodegenerative

diseases such as Parkinson and Huntington's diseases (PD and HD), macular degeneration and others. Based on iPSCs derived neurons cell model of the disorders may become superior instrument to study pathology for many reasons such as that access to the cells of the human being for research applications is limited or lack of adequacy of existing animal and cell models.

In our research we generated multiple human iPSC lines from patients with PD, HD and familia macular degeneration. Human dermal fibroblasts were infected with lentiviruses containing transcription factors: OCT4, SOX2, c-Myc, KLF4. These genes are commonly used in most studies for the induction of somatic cells to pluripotent state. It was shown, that our iPSC lines express pluripotent cells markers and can be differentiated into three germ layers cells. We have developed an efficient protocol for obtaining specific neuroepithelial cells from pluripotent.

Ш. Миталипов

Новые репродуктивные технологии для профилактики митохондриальных заболеваний

Орегонский национальный центр изучения приматов, Орегонского университета здоровья и науки, Портланд, США

Митохондрии — клеточные органеллы отвечающие за выработку основной энергии для клетки. Митохондрии также содержат свои собственные гены (ДНК), и мутации в митохондриальной ДНК являются причиной целого ряда наследственных и приобретенных заболеваний, таких как рак, деменция, сахарный диабет, сопровождающийся глухотой; потеря зрения, а также тяжелые пороки и поражения сердца, мозга, мышц и печени. Поскольку ДНК митохондрий наследуются только по материнской линии, через яйцеклетку, то эти болезни передаются в основном от матери к детям.

Наша лаборатория разработала технологию, позволяющую заменить дефектную митохондриальную ДНК в яйцеклетках обезьян здоровыми донорскими митохондриями, взятыми от других обезьян. В результате на свет появились несколько малышей, которые унаследовали ядерные гены от матерей, но мтДНК была получена от других доноров. Ранее подобные эксперименты на животных не были успешными и считалось, что такая корректировка генов в яйцеклетках невозможна. Данные эксперименты были опубликованы в престижном научном журнале Nature (Tachibana et al., Nature 2009).

Мы надеемся, что уже в ближайшем будущем наша технология позволит полностью искоренить целый класс наследственных заболеваний, передающихся через митохондриальные гены, путем их корректировки в яйцеклетках, еще до зачатия ребенка.

S. Mitalipov

Novel Reproductive Technologies for Preventing Mitochondrial DNA Diseases

Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University, Portland, USA

Mitochondria are critical for basic cellular function due to their principal role in the production of energy. Mitochondria contain their own genome (mtDNA), which

unlike the nuclear genome, is exclusively transmitted maternally from the egg. Mutations in mtDNA occur at a 10 to 100-fold rate higher than in nuclear DNA and cells usually contain a mixture of mutant and normal mtDNA, a phenomenon known as heteroplasmy. When the mutant load reaches a certain threshold, mitochondrial function is impaired leading to serious human disorders, including myopathies, neurodegenerative diseases, diabetes, cancer and infertility.

To establish preclinical models for new therapeutic approaches, we recently demonstrated that the mitochondrial genome can be efficiently replaced in mature metaphase II arrested rhesus monkey oocytes by chromosome transfer (Tachibana et al., Nature 2009). Newly reconstructed oocytes consist of nuclear genetic material from one female and cytoplasmic components including mitochondria and mtDNA from another female. This approach yields developmentally competent oocytes suitable for fertilization and producing embryonic stem cells or healthy offspring. Potential clinical applications of this novel reproductive technology include mitochondrial gene replacement therapy to prevent transmission of mtDNA mutations and treatment of infertility caused by cytoplasmic defects in oocytes.

M. Ошимура

Искусственные человеческие хромосомы для генной и клеточной терапии

Центр инженерии хромосом, университет Тоттори, Япония

Векторы генной терапии, такие как вирусы, плазмиды, фаг-производные, бактериальные искусственные хромосомы и дрожжевые искусственные хромосомы характеризуются возможностью постепенного снижения и исчезновения экспрессии. Кроме того, интегрированные случайным образом в геном последовательности могут активировать онкогены. Этих недостатков лишены искусственные хромосомы человека (ИХЧ), представляющие собой искусственно созданные методами хромосомной инженерии в клетках DT40 минихромосомы. Различные ИХЧ проявляют свойства, которые могут быть охарактеризованы как оптимальные для идеального вектора, включая стабильную эпизомную поддержку и возможность введения регуляторных геномных локусов, позволяющих осуществляться физиологической регуляции внедрённого гена по аналогии с нативными хромосомами. Вышеуказанные свойства позволят предлагать ИХЧ в сочетании с генно-клеточными технологиями для терапии различных заболеваний.

M. Oshimura

Human artificial chromosomes for gene- and cell-therapies

Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science; Chromosome Engineering Research Center Tottori University, Japan

Random integration of conventional gene delivery vectors such as viruses, plasmids, P1 phage-derived artificial chromosomes, bacterial artificial chromosomes and yeast artificial chromosomes can be associated with transgene-silencing. Furthermore,

integrated sequences can activate oncogenes adjacent to the insertion site resulting in the activation or silencing of transgenes. Human artificial chromosome (HAC) is exogenous mini-chromosome artificially created by chromosome engineering in the DT40 cells. Various HACs exhibit several potential characteristics desired for an ideal gene delivery vector, including stable episomal maintenance and the capacity to carry large genomic loci with their regulatory elements, thus allowing the physiological regulation of the introduced gene in a manner similar to that of native chromosomes. In addition, multiple acceptor sites were introduced into the HAC. In this meeting, I introduce methods for constructing HAC vectors and potential characteristics of HACs, and various applications for basic and translational researches, gene function, iPS production and gene- and cell-therapie.

Е.А. Померанцева

Возможности профилактики и лечения наследственных заболеваний с помощью вспомогательных репродуктивных технологий

Институт Репродуктивной Генетики, Чикаго, США

E.A. Pomerantseva

The possibilities of prevention and treatment of inherited diseases using assisted reproductive technology (ART)

Reproductive Genetics Institute, Chicago, USA

Преимплантационная генная диагностика (ПГД) — это способ тестирования эмбрионов, полученных при ЭКО, позволяющий осуществить генетический контроль ЭКО по медицинским показаниям и добиться рождения здорового ребенка в семье с наследственными заболеваниями; в отличие от пренатальной диагностики данные методы не требуют прерывания беременности для предотвращения рождения больного ребенка.

ПГД позволяет:

- выполнить отбор эмбрионов, не унаследовавших родительские мутации;
- исключить хромосомные аномалии;
- узнать пол эмбриона;
- предельно резус- и Келл-фактор;
- определить HLA-профиль эмбриона.

ПГД рекомендуется:

- семьям, решившимся на рождение ребенка в позднем возрасте;
- семьям, в которых уже рождались дети с генетическими заболеваниями или семейными формами соматических заболеваний, включая опухоли, или в которых больны сами родители либо близкие родственники;
- пациенткам с привычным невынашиванием, несколькими неудачными попытками ЭКО или пузырным заносом в анамнезе;
- семьям, в которых у партнера обнаружены серьезные нарушения сперматогенеза;
- родителям детей, нуждающихся в лечении при помощи донорских гемопоэтических стволовых клеток;
- семьям, прошедшим скрининг на носительство наследственных заболеваний и знающих о риске рождения больного ребенка.

ПГД — мощный инструмент предотвращения и лечения наследственных болезней. Для проведения ПГД необходимо понимание риска наследственных заболеваний в конкретной семье, следовательно, семьям, пользующимся ВРТ, нужно проводить обследование на носительство генетических заболеваний. Кроме того, ПГД может являться самостоятельным показанием для ВРТ у пациентов с известными генетическими и репродуктивными проблемами как в личном, так и в семейном анамнезе.

Б. Фехсе, К. Корнильс, М. Хайнцелман,
К. Вольшке, Ф. Айук, Д. фон Лаер, А. Зуфали,
К. Кульке, С. Наундорф, И.В. Блау, Е. Тиль,
Г. Фаткенхауер, Д. ван Лунцен, Н. Крeгeр,
А.Р. Цандер

**Генно-модифицированные гемопоэтические
стволовые клетки для лечения пациентов
с ВИЧ-ассоциированными злокачественными
заболеваниями**

*Университетская клиника Эппендорф-Гамбург,
Германия*

Высокоактивная антиретровирусная терапия (ВААРТ) показала большую эффективность в подавлении репликации ВИЧ, однако данный вид лечения все еще недоступен для всех пациентов. Кроме того, ВААРТ не приводит к ликвидации вируса и часто сопровождается тяжелыми побочными эффектами. Кроме того, появление новых штаммов вируса также будет ограничивающим фактором в лечении пациентов.

Известно, что трансплантация генетически защищенных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), может привести к полному подавлению вирусной репликации, как убедительно показали исследования Hütter et al., которые пересаживали ВИЧ-положительным реципиентам с лейкозом ГСК от гомозиготного по CCR5 Δ 32/ Δ 32 мутантного донора. Однако такой метод из-за серьезных побочных эффектов аллогенной трансплантации будет методом выбора только у пациентов с высоким риском. Кроме того, ограничения этого метода заключаются и в малом количестве доноров: считается, что гомозиготная мутация в гене CCR5 Δ 32/ Δ 32 имеется у 1% людей кавказской популяции.

Недавно мы предложили новый принцип генной терапии на основе экспрессии мембран-связанного ингибитора (maC46) в клетках ВИЧ после трансдукции ретровирусным вектором M87o. maC46 был успешно испытан в многочисленных доклинических исследованиях, получены первые клинические данные при клинических испытаниях данной методики

с применением трансдуцированных ауто-Т-клеток у пациентов с ВИЧ (J. van Lunzen et al., 2007). Мы, в свою очередь, разработали новый клинический протокол, связанный с генетической модификацией ГСК с помощью M87o. Как мы ожидаем, клетки-мишени (Т-лимфоциты, моноциты), полученные из генно-модифицированных ГСК, будут защищены от проникновения ВИЧ. Клинический протокол предназначен для пациентов, нуждающихся в зависимости от основного заболевания в ауто- или аллотрансплантации.

B. Fehse, K. Cornils, M. Heinzelmann, Ch. Wolschke,
F. Ayuk, D. von Laer, A. Zoufaly, K. Kuhlcke, S. Naundorf,
I.W. Blau, E. Thiel, G. Fätkenheuer., J. van Lunzen,
N. Kröger, A.R. Zander

**Gene-modified stem cells for high risk
Aids-related malignancies – a new treatment
proposal**

University Hospital Hamburg-Eppendorf

Highly active antiretroviral therapy (HAART) treatment has shown great efficacy in suppressing HIV replication and AIDS, but is still not available to all patients. Moreover, HAART does not lead to virus elimination and is often accompanied by severe side effects. Additional limiting factors include patient compliance and appearance of multiple-resistant HIV strains. On the other hand, transplantation of genetically protected haematopoietic stem cells (HSC) may lead to complete suppression of viral replication, as convincingly demonstrated by Hütter and colleagues who transplanted an HIV-positive leukaemia patient with HSC from a donor homozygous for the CCR5 Δ 32/ Δ 32 mutation. However, due to severe side effects allogeneic HSCT would be an option for high-risk patients, and app. 1% of Caucasians have a CCR5 Δ 32/ Δ 32 donor, only. Therefore, gene therapy may represent a promising alternative. We have recently introduced a novel gene therapy principle based on expression of a membrane-anchored entry inhibitor (maC46) in HIV target cells transduced with the retroviral vector M87o. maC46 has successfully been tested in numerous preclinical systems and a first clinical study using autologous T cells from HIV patients (van Lunzen et al 2007). We have now developed a new clinical protocol involving the genetic modification of HSC with M87o. Based thereon, HIV target cells (T cells, monocytes) derived from gene-modified HSC are expected to be protected from HIV entry. The clinical protocol is designed for patients in need of autologous or allogeneic HSCT, depending on the underlying disease. Study outline and preliminary patient data will be presented.

Материалы симпозиума

В.Г. Богдан¹, М.М. Зафранская², Ю.М. Гаин²,
С.С. Багатка²

Подготовка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека к аутотрансплантации

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

² Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Республика Беларусь
bogdan - 5@mail.ru

V.G. Bogdan, M.M. Zafranskaya, Y.M. Gain,
S.S. Bagatka

Preparation of Multipotential mesenchymal stromal cells of adipose Tissue of Human for Autotransplantation

Традиционно, предтрансплантационная подготовка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) из жировой ткани (ММСК ЖТ) человека проводится путем культивирования в пролиферативной среде, содержащей 10% плодной коровьей сыворотки (ПКС), 100 IU/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамин. Недостатками способа являются: а) наличие ксеногенных белков в культуральной среде, создающее угрозу развития анафилактических реакций и осложнений при последующей трансплантации человеку; б) отсутствие аутогенных ростовых факторов в естественных (биологических) концентрациях; в) длительные сроки культивирования для получения необходимого объема культуры клеток.

Цель исследования: разработать и оценить эффективность нового способа предтрансплантационной подготовки ММСК ЖТ человека.

Материалы и методы. Материал для исследования — ММСК, выделенные из жировой ткани 5 пациентов. Получение биологического материала проводили строго после оформления добровольного информированного согласия пациента; манипуляцию осуществляли под местным обезболиванием инцизионным способом. Для выделения ММСК ЖТ гомогенизированную ЖТ промывали стерильным раствором Хенкса и инкубировали в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа в фосфатно-солевом буфере при 37°C. Полученные клетки отмывали, клеточный осадок ресуспендировали и высевали в концентрации 5×10^4 клеток на 1 см² в культуральные чашки. Обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП) получали из периферической аутокрови человека (20 мл), взятой с антикоагулянт — гепарином, с последующим двойным центрифугированием и отделением плазмы с тромбоцитами от эритроцитов и лейкоцитов. Для оценки влияния ОТП на морфо-фенотипические особенности клеток использовались клеточные культуры ММСК ЖТ человека 2–3 пассажей, культивируемые по разработанному способу в присутствии 20% ОТП (решение о выдаче патента РБ №А20110181 26.04.2011). В качестве контроля рассматривались аналогичные культуры клеток, культивируемые в условиях 10% ПКС. Им-

мунофенотипический анализ проводили с использованием проточного цитометра FC 500 (Beckman Coulter, США). Для анализа секреции сосудистого эндотелиального фактора роста культурами ММСК использовали набор для ИФА VEGF человека (R&D Systems, Канада).

Результаты и обсуждение. Добавление в культуральную среду ОТП человека не влияло на изменение морфологии полученных культур клеток. Данные клеточные культуры характеризовались сходными морфологическими особенностями и были представлены фибробластоподобными веретеновидными клетками.

Жизнеспособность культур ММСК в течение всего процесса культивирования как в 10% ПКС, так и в 20% ОТП составляла порядка 98,0% ($97,3\% \div 99,2\%$), без достоверных отличий ($p > 0,05$).

Иммунофенотипический анализ показал, что абсолютное большинство клеток, культивируемых с различным составом сывороточных/плазменных белков, характеризовались специфичным для ММСК фенотипом поверхностных антигенов CD90⁺/CD105⁺/CD44⁺/CD119⁺/CD34⁻CD45⁻CD31⁻. Следует отметить высокий уровень экспрессии CD71, который свидетельствует о пролиферативной активности клеток, культивируемых как в присутствии 10% ПКС, так и при 20% ОТП.

Анализ динамики продукции сосудистого фактора роста свидетельствовал о способности ММСК продуцировать ангиогенный фактор на протяжении длительного времени, при этом концентрация VEGF в супернатантах клеточных культур оставалась постоянной. Так, уровень продукции VEGF культурами ММСК жировой ткани в присутствии 10% ПКС, составил 8456,6 (8100,0÷8800,1) пг/мл на 4-й день культивирования и 8122,7 (7800,5÷8750,6) пг/мл на 12 день культивирования, тогда как в присутствии ОТП концентрация VEGF в супернатантах конфлюэнтных культур ММСК составила 9017,1 (8900,5÷9200,1) пг/мл и 8897,3 (8700,3÷9120,1) пг/мл, соответственно ($p < 0,05$).

Для оценки влияния условий культивирования на темп роста клеточных культур ММСК, предварительно посаженные в одинаковой концентрации, были сняты на 7 сут. с расчетом концентрации на мл среды. Число удвоений клеточных популяций рассчитывалось как $\log_{10}$ отношения числа клеток, полученных после трипсинизации, к числу посаженных клеток, умноженные на 3,33. Более высокий прирост клеток ($p < 0,05$) отмечен при культивировании ММСК в среде, содержащей 20% ОТП (коэффициент прироста — 4,9), по сравнению с культивированием с 10% ПКС (коэффициент прироста — 2,5).

Выводы: Длительное культивирование ММСК ЖТ человека в ОТП сохраняет стабильность фенотипа и высокую жизнеспособность. Положительное влияние ОТП на скорость роста культуры ММСК ЖТ человека, пролиферацию, продукцию ангиогенного фактора роста стволовых клеток, в сочетании с высоким содержанием естественных ростовых факторов и аутологичным происхождением, позволяет обоснованно рекомендовать разработанный нами способ предтрансплантационной подготовки ММСК

ЖТ человека для широкого практического применения.

Исследование выполнено в рамках Инновационного проекта ГКНТ РБ (№ госрегистрации: 20100954).

И.Я. Бозо^{1,2}, Р.В. Деев¹, А.Ю. Дробышев²,
Д.В. Галецкий³, В.О. Королев³, Е.С. Филоненко⁴,
С.Л. Киселев⁵, А.А. Исаев¹

Эффективность геннотерапевтического остеопластического материала в замещении костных дефектов

¹ Институт Стволовых Клеток Человека, Москва, Россия

² Московский государственный медико-стоматологический университет, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

⁴ Научно-исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, Россия

⁵ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия
romdey@gmail.com

I.Y. Bozo, R.V. Deev, A.Y. Drobyshev, D.V. Galeckij,
V.O. Korolev, E.S. Philonenko, S.L. Kiselev,
A.A. Isaev

Effectiveness of gen-therapeutic osteoplastic material for bone defects repair

Введение. Одной из наиболее актуальных проблем травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии является эффективное лечение пациентов с «большими костными дефектами» и дефицитом костной ткани (например, при атрофии альвеолярного отростка верхней челюсти или альвеолярной части нижней челюсти). Термин «большой костный дефект» отражает не только размеры дефекта (применительно к челюстно-лицевой хирургии, как правило, более 1 см³), но и наличие «остеогенной недостаточности» — дефицита естественных остеоиндукторов (факторы роста, парциальное давление кислорода и пр.), критически значимых для адекватного репаративного остеогенеза [Гололобов В.Г. и др., 2012]. Большинство применяющихся остеопластических материалов оказываются малоэффективными в условиях остеогенной недостаточности, так как их действие сводится лишь к оптимизации репаративного процесса за счет остеокондукции и привнесения «строительного материала» для костного регенерата, чего достаточно только для замещения малых костных дефектов. В то же время, лечение пациентов с большими костными дефектами и дефицитом костной ткани требует применения материалов с выраженной остеоиндукцией и (или) остеогенностью, обеспечиваемых включением в состав материалов активных компонентов: факторов роста, клеток или нуклеиновых кислот, составляющих три ортодоксальных тренда разработок остеопластических материалов.

Цель исследования: оценить эффективность принципиально нового (геннотерапевтического) остеопластического материала в замещении больших костных дефектов.

Материал и методы. Для выполнения исследования были разработаны геннотерапевтические

остеопластические материалы с использованием ДНК-плазмид с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) и двух различных носителей: №1 — синтетический коллаген-гидроксиапатитный; №2 — ксеногенный депротеинизированный костный матрикс. Исследование выполнено на самках кроликов (n = 22) весом 2,0–2,5 кг, которым под местным обезболиванием с премедикацией были нанесены дефекты (диаметром 8–10 мм) обеих теменных костей. Известно, что при таких дефектах из-за остеогенной недостаточности не происходит гистотипическая репаративная регенерация.

Животные были разделены на три группы: в первой и второй группах выполнялась имплантация геннотерапевтических остеопластических материалов №1 или №2 в дефекты правых теменных костей (целевая сторона), а в дефекты левых вводились только соответствующие носители №1 или №2 без нуклеиновых кислот (контроль). В третьей группе в правый дефект вводился носитель №2 без нуклеиновых кислот, а левый дефект оставлялся без имплантации каких-либо материалов.

Животных выводили из эксперимента через 15, 30, 45 сут., эксплантированные крышки черепа фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, выполняли компьютерную томографию (КТ) и гистологический анализ.

Результаты и обсуждение. На сроке 15 сут., по данным КТ, во всех группах дефекты были сохранены в полном объеме, форма округлая, границы четкие, признаков остеогенеза не наблюдалось. Результаты КТ подтверждены гистологическим анализом: во всех случаях при имплантации остеопластических материалов (как геннотерапевтических, так и носителей без нуклеиновых кислот) дефекты заполнены реактивно измененной волокнистой соединительной тканью, окружающей материалы. Со стороны костных опилов определялся периферический регенерат из ретикулофиброзной костной ткани.

Через 30 сут., по данным КТ, при использовании геннотерапевтического материала №1 дефекты уменьшались в размерах в среднем на 1–3 мм, приобретали неровные контуры. В одном случае по центру дефекта определялся мостовидный рентгенконтрастный регенерат, разделивший изначальный дефект на два неравных диаметров около 2 и 3 мм соответственно. В контроле в той же группе 1 дефекты сохранялись в полном объеме, границы становились менее четкими, чем на сроке 15 сут., однако сохранялась изначальная округлая форма. При гистологическом исследовании в случае целевого материала центральные части дефектов были выполнены волокнистой соединительной тканью, носитель практически полностью резорбирован, сохранены лишь гранулы гидроксиапатита. В одном случае (в котором на КТ определялся мостовидный регенерат) в центральной части дефекта определялся участок, образованный ретикулофиброзной костной тканью. При введении носителя №2 без нуклеиновых кислот периферические зоны дефектов были выполнены ретикулофиброзной костной тканью, трабекулы которой плотно прилегали к фрагментам носителя, однако центральная часть все так же образована реактивно измененной волокнистой соединительной тканью. Без имплантации материалов дефекты сохранялись в полном объеме, а периферический остеогенез был менее выражен, чем в других группах.

Через 45 сут. в группе 1 на целевой стороне, по данным КТ, дефекты уменьшались в среднем в 1,5–2 раза, границы нечеткие, неровные. При гистологическом исследовании центральные части дефектов (1/3–1/2) выполнены волокнистой соединительной тканью, периферические — костным регенератом, образованным пластинчатой костной тканью. В контроле размеры дефектов уменьшались в среднем на 2 мм, сохранялась изначальная округлая форма. При гистологическом анализе большая часть дефектов выполнена волокнистой соединительной тканью, окружающей гранулы гидроксиапатита носителя, периферический костный регенерат менее выражен, однако также ремоделирован с образованием пластинчатой костной ткани. В группе 2 в случае имплантации геннотерапевтического остеопластического материала № 2, по данным КТ, дефект заполнен рентгенконтрастным регенератом, среди которого определялись гранулы носителя с большей плотностью по шкале Хаунсфилда, чем нативная костная ткань. При гистологическом исследовании большая часть дефекта заполнена костным регенератом. Лишь небольшой участок центральной части выполнен волокнистой соединительной тканью. Однако расположенные в данной области гранулы материала со всех сторон окружены трабекулами новообразованной костной ткани, что свидетельствует об остеоиндуцирующей активности каждого фрагмента носителя с нуклеиновыми кислотами. В то же время, в случае имплантации носителя № 2 без нуклеиновых кислот, его гранулы в центральной части дефекта были окружены лишь волокнистой соединительной тканью без признаков остеогенеза. Периферический регенерат был более выражен при использовании геннотерапевтического материала.

Выводы. Таким образом, наделение носителей кодирующими ДНК-плазмидами с геном VEGF позволяет получить принципиально новое изделие медицинского назначения — геннотерапевтический остеопластический материал, отличающийся высокой эффективностью в замещении больших костных дефектов за счет выраженной остеоиндукции.

А.В. Виноградов, А.В. Резайкин, А.Г. Сергеев

Разработка технологии секвенирования точковых мутаций гена TP53 при острых миелоидных лейкозах

Уральская государственная медицинская академия
Минздравсоцразвития России,
Екатеринбург, Россия
vinogradov - av@yandex.ru

A.V. Vinogradov, A.V. Rezaikin, A.G. Sergeev

Development of the sequencing technology for TP53 gene point mutations detection in acute myeloid leukemia

Ген TP53, локализованный на коротком плече хромосомы 17 (17p.13.1), является одним из наиболее изучаемых антионкогенов человека, играющим ключевую роль в развитии многих злокачественных опухолей, в том числе — гемобластозов. Разработаны международные электронные регистры мутаций гена TP53, в соответствии с которыми наиболее частым типом генетических аномалий TP53 являются однонуклеотидные замены (88,8%). Это придает ему

особый статус среди остальных генов-супрессоров опухолевого роста, для которых более характерны фреймшифт-мутации. Тем не менее, точная роль мутаций TP53 в молекулярных механизмах прогрессии острых миелоидных лейкозов (ОМЛ) не определена, что обуславливает актуальность исследований в этой сфере.

Цель исследования: разработать технологию секвенирования и определить частоту встречаемости и структуру точковых мутаций гена TP53 при различных ОМЛ.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 51 больной ОМЛ в возрасте от 15 до 77 лет, проходившие обследование и лечение на базе Свердловского областного онкогематологического центра с 2008 по 2012 г. Среди них с вариантом М0 по FAB-классификации наблюдались двое больных, М1 — четверо, М2 — 25, М3 — 4, М4 — 11, М4э — 3, М5 — 1, острый миелофиброз — 1.

Праймеры, фланкирующие участок мРНК гена TP53, соответствующий экзонам 4–11, разработаны с использованием депонированных в GenBank нуклеотидных последовательностей (BC003596, NM_000546, X02469, таблица).

Последовательности праймеров для амплификации и секвенирования гена TP53

Название	Последовательность	Позиция
P53-F	5' AGT CAG ATC CTA GCG TCG AG 3'	211–230
P53-R	5' TGG CGG GAG GTA GAC TG 3'	1320–1336
P53-S1	5' ACA TTT TCA GAC CTA TGG AA 3'	249–268
P53-S2	5' GCG CCA TGG CCA TCT ACA AG 3'	670–689
P53-S3	5' ACC CTT TTT GGA CTT CAG GT 3'	1300–1319

Выделение мРНК проводили методом сорбции на силикагелевом носителе с помощью набора реагентов «РИБО-сорб» (ЦНИИ Эпидемиологии, Москва, РФ) в соответствии с инструкциями производителя. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали набор «РЕБЕРТА-L-100» того же производителя.

С помощью разработанной тест-системы определена последовательность нуклеотидов гена TP53 с 85 по 1116 (позиции указаны в соответствии с NM_000546, GenBank), что соответствует аминокислотным остаткам 29–372. Таким образом, исследованная область гена включает 3' часть экзона 3, полную последовательность экзонов 4–11 и 5' часть экзона 12, кодирующие все функциональные домены белка.

Секвенирование ДНК проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 310 с использованием реакционной смеси ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.0 (Applied Biosystems, США). Сопоставление сегментов, выравнивание и сравнение последовательностей нуклеотидов и аминокислот проводили с использованием компьютерной программы MEGA, версия 3.1.

Результаты исследования и их обсуждение. Точковые мутации гена TP53 выявлены в 46 случаях (90,2%), в том числе изолированная замена C215G (P72R), которую большинство исследователей

считает полиморфным вариантом TP53 — 44 наблюдения (86,3%). В одном случае у больного ОМЛ М2 с комп-лексными изменениями кариотипа (47, XY, del(3)(p12), del(5)(q31), add(17)(p13), -7, +21, +mar) и наличием C215G определялась делеция тимидина в 645 позиции (ДНК-связывающий домен), что приводило к досрочной терминации синтеза белка p53 и потере его функциональной активности. В другом наблюдении при ОМЛ М4 с кариотипом 52, XYY, inv(3)(p12;q24), +1, +9, +11, +13, +19, +Y, +mar дополнительно определялась несинонимичная замена G733T в первой позиции кодона GGC, приводящая к аминокислотной замене G245C в ДНК-связывающем домене p53.

В двух случаях у больных ОМЛ М2 без C215G определялись изолированные аминокислотные замены в ДНК-связывающем домене p53, приводящие к изменению его функциональной активности. В первом наблюдении — несинонимичная замена G841C в первой позиции кодона GAC, приводящая к аминокислотной замене D281N, у больной с комплексными изменениями кариотипа (42, X, addi(1)(q31), addi(12)(q24), del(15)(p12), addi(16)(p13), del(18)(p12), -3, -9, -13, -X). Во втором случае — мутация A377G во второй позиции кодона TAC, обуславливающая замену Y126C, у пациентки с диплоидным кариотипом опухолевых blastov.

Заключение. Таким образом, по нашим данным, общая частота точковых мутаций гена *TP53* при ОМЛ составила 7,8%, в том числе замены — 5,9%, делеции — 1,9%, при этом в большинстве случаев (3 из 4) они были ассоциированы с комплексными изменениями кариотипа. Полиморфный вариант гена, содержащий замену C215G, определялся у абсолютного большинства больных (90,2%). Прогноз ОМЛ у больных с мутантным *TP53* оказался неблагоприятным. Во всех случаях (4 наблюдения) опухолевые blastov оказались резистентными к программной полихимиотерапии циторабином и даунорубицином, а вероятностная выживаемость пациентов не превышала 3 мес.

Д.Ю. Гребнев, А.П. Ястребов, И.Ю. Маклакова,
С.В. Сазонов, С.Л. Леонтьев

Сравнительный анализ регенерации эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток

Уральская государственная медицинская академия
Минздравсоцразвития России,
Екатеринбург, Россия
УЗСО Институт медицинских клеточных технологий,
Екатеринбург, Россия
IMCT@yandex.ru

D.U. Grebnev, A.P. Yastrebov, I.U. Maklakova,
S.V. Sazonov, S.L. Leontyev

Comparative analysis of the regeneration of the epithelium of jejunum mature and old laboratory animals in acute blood loss on the background of stem cells transplantation

Определяющим фактором в восстановлении регенерации быстро обновляющихся тканей является количество и функциональная активность стволовых клеток. После воздействия экстремальных факторов, а также с возрастом происходит снижение их числа.

Увеличивая представительство стволовых клеток, воздействуя на их пролиферативный потенциал, можно увеличить скорость клеточного обновления в эпителии тощей кишки. В настоящем исследовании проводилась сравнительная оценка влияния сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) на регенерацию эпителия тощей кишки зрелых и старых лабораторных животных в условиях острой кровопотери.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 36 белых лабораторных мышках-самцах возраста 3–4 мес., массой 25–30 г и 36 мышках-самцах возраста 3 года, массой 50–55 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК (из плаценты и пуповинной крови) выполнены на 24 лабораторных животных мышках-самках возраста 3–4 мес., срок гестации 18 дней. Животные были разделены на 2 группы: опытная группа — животные с острой кровопотерей и контрольная группа — животные в физиологических условиях. Массивную кровопотерю вызывали кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы: опытная подгруппа — внутривенное (в/в) введение ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 300 тыс. кл./кг в 0,2 мл физ. раствора; животным контрольной подгруппы в/в вводилось 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после кровопускания однократно в указанных выше дозах. Оценивали пролиферативную активность кишечного эпителия с помощью определения митотического индекса (МИ) на гистологических срезах продольной ориентации. Подсчитывали встречающиеся на 3000–3500 клеток, полученный результат выражали в процентах. Оценивали уровень запрограммированной гибели эпителиоцитов с помощью определения апоптотического индекса (АИ) на гистологических срезах продольной ориентации. Подсчитывали эпителиоциты с морфологически выявляемой картиной апоптоза встречающиеся на 3000 клеток, полученный результат выражали в процентах. Среднюю клеточность в одной крипте определяли, как отношение общего числа подсчитанных криптальных клеток к количеству анализированных крипт, выраженное в процентах. Количественная оценка апоптоза осуществлялась при флуоресцентной микроскопии с использованием двух флуорохромов: акридин оранжевым (производство Финляндия) и Annexin V — FITC fluorescence microscopy (производство США).

Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднее арифметическое, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий между подгруппами оценивали с помощью *t* — критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. На 5 сут. после трансплантации ММСК и ГСК в физиологических условиях при изучении обзорной гистологической картины стенки тощей кишки зрелых лабораторных животных установлено повышение содержания клеток в состоянии митоза на 22,5% относительно группы контроля. При этом количество клеток в состоянии апоптоза и средняя клеточность крипты существенно не изменились относительно значений нормы. В то же время у старых лабораторных животных отмечено снижение апоптотического индекса на 21,7%, а также выявлено отсутствие значимой разницы при подсчете числа ми-

тозов, средней клеточности 1 крипты по сравнению с контролем. На 5 сут. после острой кровопотери на фоне трансплантации стволовых клеток у зрелых и старых лабораторных животных отмечено увеличение содержания криптального эпителия относительно контрольной подгруппы на 30,1% и на 21,4% соответственно, увеличение митотического индекса до значений нормы, снижение уровня апоптоза по сравнению с контролем.

Таким образом, в слизистой оболочке тощей кишки сочетанная трансплантация ММСК и ГСК оказывает антиапоптогенное действие, повышает митотическую активность криптального эпителия, что приводит к восстановлению клеточности эпителиоцитов крипт тощей кишки старых животных до значений нормы.

В.Б. Грицак, К.С. Десятниченко

Способы восстановления объема костной ткани челюстно-лицевой области ксенотрансплантантом и остеопластическими материалами с одномоментной или отложенной дентальной имплантацией

НПО Полистом, Москва, Россия
clinic23@yandex.ru

V.B. Gricajuk, K.S. Desjatnichenko

Methods for recovery of bone maxillofacial area using a xenograft and osteoplastic materials with simultaneous or delayed dental implantation

Основным фактором, ограничивающим применение дентальной имплантации, является недостаточный объем костной ткани, в которой необходимо разместить внутрикостную часть имплантата. Одним из способов решения этой проблемы является костная пластика с использованием природных и (или) синтетических остеопластических материалов, что приводит к немедленному или отложенному увеличению объема костной ткани. Достаточное количественное и качественное состояние костной ткани в зоне имплантации является основной составляющей успеха дальнейшего восстановления зубного ряда, реализации основных целей хирургического и ортопедического лечения вторичной адентии.

Цель работы состоит в исследовании сочетанного использования ксенотрансплантата и остеопластических материалов в гелевой форме как подготовительного этапа дентальной имплантации.

Прооперированы 9 пациентов так называемой группы риска (возраст старше 45 лет, значительная атрофия альвеолярного отростка, вторичная адентия, причиной которой являются заболевания пародонта в анамнезе). Применение в подобных клинических случаях идеальной для пересадки аутокости технически сильно затруднено, а иногда невозможно. Были использованы девитализированная ксенокость «Остеоматрикс» («Конектбиофарм», Россия) и остеопластические материалы «Индост гель» и «ТрАпекс гель» (НПО «Полистом», Россия). Дентальные имплантаты для отложенной и (или) немедленной имплантации системы «Dentium Implantium» (Республика Корея).

Подготовка к операции включала в себя: 1) выполнение регламентных клинических и биохимических анализов крови (клеточный состав, гемоглобин,

сахар, ВИЧ, гепатиты, сифилис и др.); 2) конусная лучевая компьютерная томография; 3) санация полости рта.

Ход операции: под инфильтрационным и проводниковым обезболиванием Sol. Ultracaini D. S. производили разрез по гребню альвеолярного отростка. Мобилизовали два слизисто-надкостничных лоскута трапецевидной формы. Обнажали поверхность костной ткани альвеолярного отростка. Из блоков «Остеоматрикс» изготавливали в условиях асептики имплантируемый фрагмент необходимой формы и объема. Ксенотрансплантант фиксировали к кости реципиента вкручиваемыми имплантатами, и (по необходимости) при помощи микросаморезов фирмы «Dentium Implantium», затем полностью пропитывали гелеобразным остеопластическим материалом. Лоскуты подтягивали и ушивали наглухо мононитью или ненабухающим шовным материалом (Atrauman, Eticoth).

Послеоперационный период в 7 случаях проходил без особенностей, на 7 сут. после операции снимали швы. В одном случае произошло отторжение трансплантата по типу лизиса ткани и периостита. В другом — потребовалось применение массивной антибактериальной терапии. Во всех случаях проводилось ситуационное симптоматическое лечение, десенсибилизирующая терапия, перевязки с обеспечением достаточного уровня гигиены, местное лечение. На 7–10 сут. после вмешательства определялся демаркационный вал локальной гиперемии слизистой в зоне происходящей замены трансплантата новообразованной костной тканью, который перемещался по мере нарастания неоостеогенеза и резорбции имплантированного материала. Демаркационная линия, которая вначале определялась как узкая полоска гиперемизированной слизистой с незначительным пролиферативным валом, перемещалась от основания трапеции лоскута к его вершине, и это перемещение меняло характер слизистой — до линии она рыхлая и даже застойная, после линии бледнорозовая и неподвижно прикрепленная к кости. Ближайшие результаты (60 сут.) по клинкорентгенологическим данным показывают прирост костной ткани в зоне имплантации от 40 до 60% от объема имплантированного материала. Максимальный срок наблюдения 1,5 года.

На данный момент 7 из 9 оперированных пациентов закончили ортопедический этап лечения и пользуются несъемными металлокерамическими конструкциями. Один находится в процессе производства ортопедических работ. Один пользуется съемными протезами.

Таким образом, в клинических условиях невозможности применения аутооттрансплантации и сомнительных прогнозах дентальной имплантации (возрастные особенности, отягощение анамнеза заболеваниями пародонта, остеопороз костной ткани, недостаточное качество собственной костной ткани пациента, значительная атрофия альвеолярных гребней, костные дефекты после перенесенных заболеваний или травм) необходимость наращивания костной ткани не за счет уменьшения резонаторной способности околоносовых пазух, но за счет приведения объема костной ткани к физиологической и анатомической норме методом выбора является сочетанное применение ксенотрансплантата и остеопластических материалов в гелевой форме. При этом стероидный противовоспалитель-

ный препарат, содержащийся в геле, купирует иммунную реакцию на ксеноматериал и, способствуя резорбции ксенотрансплантата, освобождает депонированные в нем местные факторы роста.

К.С. Десятниченко, Е.А. Веселова

**Восстановление суставного хряща
посредством внутриакулярного введения
хондропротектора в гелевой форме**

НПО Полистом, Москва, Россия
stimbone@yandex.ru

K.S. Desyatnichenko, E.A. Veselova

**Articular cartilage reparation after
intraarticular introduction of cartilage
protector in gelous form**

Остеоартроз (ОА) — хроническое дегенеративно-дистрофическое заболевание суставов, характеризующееся прогрессирующей деструкцией суставного хряща и сопровождающееся реактивным синовитом. Развитие ОА является результатом взаимодействия механических и биологических факторов, которые приводят к нарушению баланса между деградацией и синтезом матриксов суставного хряща и субхондральной кости. ОА составляют не менее трети всех заболеваний опорно-двигательного аппарата, приводящих к инвалидности, что определяет *актуальность* поисков средств их лечения.

Наиболее часто применяемыми препаратами для лечения ОА являются симптоматические быстродействующие препараты, к которым относятся кортикостероиды и нестероидные противовоспалительные средства. Более эффективным является патогенетическое лечение, посредством применения фармакологических препаратов, стимулирующих репаративную регенерацию суставного хряща. К этой группе относятся гетерополисахариды, которые являются составными частями межклеточного вещества суставного хряща. Однако у части больных при развитии ОА появляются антитела к протеогликанам, в силу чего применение этих препаратов может привести к усугублению патологического процесса. Представляются очевидными преимущества применения для лечения ОА не имеющих антигенных свойств низкомолекулярных дериватов протеогликанов и коллагена. Кроме того, при пероральном и транскутанном применении поздно восстанавливается функция внутрисуставной смазки синовиальной жидкости, поэтому целесообразно их введение непосредственно в суставную полость в среде, сравнимой по лубрикационным свойствам с нативной синовиальной жидкостью.

Целью работы было создание ткане-инженерной конструкции, стимулирующей регенерацию гиалинового хряща, обладающей лубрикационными свойствами, для внутриакулярного применения.

Для приготовления хондропротектора получали костный коллаген концентрации 2 г/100 мл, и вязкости 8,52 мПа·с, соответствующей нормальной синовиальной жидкости. В полученном геле суспендировали хондропорон (патент РФ № 2327478), состоящий из гидролизата хряща трахеи крупного рогатого скота и ортофосфата кальция, в соотношении 1:9 по массе.

Эксперимент выполнен на 20 крысах самцах сублинии Август, которым в условиях асептики и ане-

стезии создавали клиновидный дефект суставного хряща большеберцовой кости, а спустя 2 нед. трижды в полость коленного сустава вводили по 0,2 мл хондропротектора в гелевой форме (опыт) или 0,15 М NaCl (контроль). Выведение животных из опыта осуществляли через 2 нед. после создания дефекта, 2 нед. и 1 мес. после введения препарата. Для последующего исследования выделяли оперированные суставы, которые подвергали морфологическому исследованию *in legunt artis*.

Через 2 нед. после создания дефекта у всех животных были выявлены реактивный синовит, отек, сильный болевой синдром, неправильная постановка конечности и выключение ее из стато-локомоторного акта. При анализе гистологических препаратов выявлено: в зоне дефекта хрящевого покрытия деструктивные преобразования затрагивают все компоненты метаэпифиза — суставной хрящ и субхондральную кость. Хрящ неравномерной толщины с трещинами и щелями различной конфигурации и протяженности. На отдельных участках суставной поверхности латерального мениска большеберцовой кости он сильно истончен, вплоть до обнажения субхондральной кости.

Описанная картина в контроле сохраняется до конца эксперимента без существенных изменений. Через 14 сут. после первой инъекции препарата в опыте выявлено, что заполнение дефекта происходит за счет формирования волокнистой соединительной ткани, характеризующейся неупорядоченной ориентацией волокон, которая выполняет роль «спайки», объединяющей неповрежденные участки суставной поверхности. Через месяц после первого введения препарата у животных этой группы параллельно с купированием клинических симптомов ОА происходят структурные регенеративные преобразования суставного хряща, которые привели к локальному восстановлению суставной поверхности, поверхностная зона хрящевого покрытия на данном этапе наблюдения приобретает клеточную специфику гиалиновой хрящевой ткани. По мере прогрессирования репаративного процесса, происходит выравнивание нарушенных контуров суставной поверхности и образование целостного суставного покрытия.

Таким образом, использование хондропротектора в гелевой форме привело к восстановлению хрящевой ткани после развития посттравматического ОА. Влияние на репаративный хондрогенез, вероятно, обусловлено связыванием интегринными предшественниками хондробластов низкомолекулярных дериватов сульфатированных гликозаминогликанов, содержащихся в хондропротекторе, что стимулирует их пролиферативную активность, а по достижении достаточной клеточной плотности — дифференцировку в хондробласты. Репаративные процессы распространялись и на субхондральную костную ткань.

Интраартикулярный способ введения обеспечивает непосредственный контакт действующих веществ ткане-инженерной конструкции с клетками поврежденной суставной поверхности. Коллагеновый гель частично возмещает лубрикационную функцию синовиальной жидкости сустава, что оптимизирует биомеханическую ситуацию в суставе и способствует активизации процессов репаративного хондрогенеза и остеогенеза.

В.Н. Ждан, А.А. Капустянская, В.И. Шепитко,
А.Л. Челишвили

Влияние препарата

«Криоцелл – криоэкстракт плаценты» на уровень тестостерона в комплексном лечении обострения подагрического артрита у больных с ожирением

Украинская медицинская стоматологическая
академия, Полтава, Украина
nusakap@gmail.com

V.N. Zhdan, A.A. Kapustyanskaya, V.I. Shepitko,
A.L. Chelishvili

The influence of the preparation «Cryocell – cryo extract of placenta» on the level of testosterone in the complex treatment of acute gouty arthritis in patients with obesity

Целью исследования была оценка влияния препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» на уровень тестостерона при обострении подагрического артрита у больных с ожирением.

Материалы и методы исследования. Под нашим наблюдением находилось 107 мужчин, больных подагрическим артритом с ожирением. Диагноз подагрического артрита установлен согласно критериям, рекомендованным ВОЗ (2000) и Ассоциацией ревматологов Украины (2004). Ожирение определяли согласно рекомендациям ВОЗ (1997 г.). Средний возраст пациентов составил $48,8 \pm 0,75$ года, от 32 до 73 лет. Медиана возраста дебюта заболевания составила 49,2 года. Длительность заболевания колебалась от 1 до 10 лет (в среднем $6,0 \pm 0,66$ года). По характеру лечения больные были разделены на следующие группы: первая группа – 52 человека (48,6%) – основная – больные подагрическим артритом с ожирением, на фоне базисной терапии дополнительно получали препарат группы «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» (КЭП) в дозе 1,8 мл внутримышечно через день трижды. Вторая группа – 55 человек (51,4%) – сравнительная – больные подагрическим артритом с ожирением, получавшие только базисную терапию. Базисная терапия назначалась согласно рекомендациям Европейской антиревматической лиги (EULAR, 2005) и клиническим протоколам предоставления медицинской помощи больным с подагрой (Приказ МЗ Украины от 12.10.2006 № 676), протоколам оказания медицинской помощи по специальности «эндокринология» (Приказ МЗ Украины от 22.05.2009 № 356).

Результаты исследования. У всех мужчин с ожирением наблюдается снижение уровня тестостерона. Это подтверждает важность определения уровня тестостерона для больных подагрическим артритом с ожирением. Так, снижение уровня тестостерона, особенно при наличии ожирения II и III степени, характеризуется максимальной гиперурикемией, подтверждая данные о связи абдоминального ожирения с уровнем тестостерона у больных подагрическим артритом. На гиперурикемию влияют течение подагрического артрита, форма артрита и наличие периферических тофусов. В свою очередь, уровни урикемии и тестостерона влияют на выраженность ожирения у больных подагрическим артритом. Тяжесть ожирения напрямую зависит от показателей тестостеронемии. Подагрический

артрит у больных с ожирением ассоциируется с высоким уровнем мочевой кислоты и низким уровнем тестостерона. Подтверждена обратная корреляция между уровнями тестостерона и мочевой кислоты ($r = -0,82$, $p < 0,05$). Также, при анализе андрогенного дисбаланса у больных с ожирением, установлена достоверная корреляционная связь между уровнем тестостерона и ИМТ ($r = 0,56$, $p < 0,05$), объемом бедер ($r = 0,58$, $p < 0,05$). Развитие ожирения у больных подагрическим артритом влияет на снижение уровня тестостерона в крови.

Использование КЭП в комплексном лечении уже через 1 нед. позволило достоверно увеличить уровень тестостерона у больных первой группы (с $11,23 \pm 0,39$ до $12,96 \pm 0,42$, $p < 0,05$), против показателя (с $10,91 \pm 0,33$ до $10,97 \pm 0,37$, $p < 0,05$) во второй группе; через 4 нед. – у больных первой группы (с $11,23 \pm 0,39$ до $15,12 \pm 0,37$, $p < 0,05$), против показателя (с $10,91 \pm 0,33$ до $11,2 \pm 0,37$, $p < 0,05$) во второй группе; через 12 нед. – у больных первой группы (с $11,23 \pm 0,39$ до $17,92 \pm 0,33$, $p < 0,05$), против показателя (с $10,91 \pm 0,33$ до $11,9 \pm 0,47$, $p < 0,05$) у больных второй группы. При применении комплексной терапии с использованием КЭП у больных первой группы мы наблюдали положительную динамику антропометрических данных. Во второй группе показатели ИМТ не претерпели достоверных изменений. Недостаточный уровень тестостерона способствует накоплению жировой ткани. Поэтому считаем, что именно из-за восстановления уровня тестостерона у больных первой группы достигли стабилизации массы тела с постепенным ее снижением. При применении комплексной терапии с использованием КЭП не отмечалось супрафизиологичных пиковых концентраций тестостерона в течение всего периода наблюдения. Сниженный уровень концентрации тестостерона приводит к повышению уровня маркеров воспаления, и в свою очередь, может способствовать развитию и прогрессированию ожирения. В целом, эффективность лечения в первой группе значительно превышала таковую в другой. Необходимо отметить, что наибольший эффект от предложенной комплексной терапии с КЭП наблюдался через 12 нед. после начала терапии. Достоверно увеличился уровень тестостерона на 59,57% у больных первой группы ($p < 0,05$) против 9,07% ($p < 0,05$) во второй группе. Установлено, что после использования КЭП в комплексном лечении уровень тестостерона в течение 12 нед. поддерживается в физиологических пределах, без патологических повышений и снижений. Комплексная терапия с КЭП имеет значительное преимущество перед другими схемами лечения, которые в среднем предполагают 22 инъекции тестостерона в год.

Выводы. Использование препарата «Криоцелл – криоэкстракт плаценты» в комплексном лечении обострения подагрического артрита у больных с ожирением приводит к повышению и нормализации уровня тестостерона на фоне клинического улучшения у больных с сочетанной патологией.

С.Ю. Жидких, С.В. Горюнов, Ю.Г. Суздальцева,
Н.В. Жидких, А.И. Привиденцев, И.С. Абрамов,
К.Н. Ярыгин, В.А. Ступин

**Применение мезенхимальных
стволовых клеток, выделенных из стромы
пуповины новорожденного,
в лечении хронических ран**

ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия
ГКБ №15 им. О.М. Филатова, Москва, Россия
serzhi03@mail.ru

S.J. Zhidkikh, S.V. Gorjunov, J.G. Suzdaltseva,
N.V. Zhidkikh, A.I. Prividentsev, I.S. Abramov,
K.N. Jarygin, V.A. Stupin

**Application of mesenchymal stem cells,
excrete from strom umbilical cords
of the neonatal, in treatment chronic
wounds**

Целью данной работы являлось исследование возможности, эффективности и безопасности применения мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из стромы пуповины новорожденного, в лечении хронических ран.

Материал и методы. В исследовании использовались выделенные клетки из пуповины (Вартониева студня) человека после нормальных родов на 38–40 нед. гестации. Культивированные адгезивные клетки стромы пуповины были охарактеризованы по цитофенотипическим признакам и по способности к дифференцировке в жировую, хрящевую и костную ткань, проверены на инфекционную безопасность.

Проведенные доклинические и I фаза клинических исследований показали, что инъекции суспензии мезенхимальных стволовых клеток (МСК) пуповины не приводили к появлению нежелательных реакций местного и системного характера.

Во 2 фазе клинических исследований приняло участие 108 пациентов с хроническими ранами различного генеза. Из них 59 пациентов составили основную группу и 49 пациентов группу сравнения. Средний возраст больных в группах — 60 ± 4 лет. Распределение по полу и возрасту в группах было сопоставимо. Средняя площадь раневых дефектов на момент включения в исследование в конце I фазы и начале II фазы раневого процесса составила в основной группе $28,5 \text{ см}^2$, в группе сравнения $31,1 \text{ см}^2$. Распределение по генезу хронических ран в основной группе, так и в группе сравнения, составило 17% венозная патология, 8% артериальная патология, 30% синдром диабетической стопы, 40% смешанная сосудистая патология и 3% пролежни. Нарушение микро- и макроциркуляции как в основной группе, так и в группе сравнения у 80% пациентов было в стадии субкомпенсации. По виду раневых дефектов в группах распределение выглядело следующим образом: послеоперационные раны составили 34%; трофические язвы 35%; синдром диабетической стопы 30%; пролежни 4%. У большинства пациентов (в 85% случаев) хронические раны локализовались на нижних конечностях.

Клеточная терапия проводилась введение культуры аллогенных мезенхимальных клеток по периферии раневой поверхности и в дно раневого дефекта культуры в количестве от 1 до 10 млн клеток в зависимости от размеров раневого дефекта.

Для оценки эффективности клеточной терапии использовали прямые показатели динамики раневого процесса, включающие планиметрические обследования и качественные показатели, а также оценку изменений гликемического профиля, микробиологическое исследование раневого отделяемого. Оценка микроциркуляции проводилась с помощью аппарата лазерной доплерофлоуметрии (ЛДФ) и транскутанного измерения кислорода тканей (TCrO_2).

При обработке полученных данных выявлено значимое ускорение репаративных процессов раневых дефектов в течение 12 ± 2 сут. после обкалывания культурой аллогенных МСК, которое проявлялось уменьшением площади раневых дефектов на 35% ($p > 0,05$) больше, чем в группе сравнения, а скорость эпителизации увеличилась в основной группе на 2,38 ($p > 0,05$). Выявлены изменения качественных показателей, таких как активный рост грануляционной ткани в основной группе 62,9%, в отличие от группы сравнения 22,4% ($p > 0,05$). Также отмечено снижение местных воспалительных и ишемических явлений (до 50%) по сравнению с контрольной группой. При оценке микроциркуляции по данным (ЛДФ) и (TCrO_2) отмечается улучшение показателей на 15–20% по сравнению с исходным и 10–15% по сравнению с контрольной группой.

В ходе исследования не было зарегистрировано значимых побочных эффектов и аллергических реакций, а также развития новых заболеваний (онкопатология), связанных с проведением клеточной терапии.

Положительный эффект после проведения клеточной терапии в лечении хронических ран, характеризующийся активизацией репаративных процессов в раневом дефекте, может быть объяснен выявленными в лаборатории клеточных технологий свойствами МСК пуповины, которые экспрессируют ростовые и ангиогенные факторы, стимулирующие рост сосудов, и приводящие к улучшению трофики в тканях. МСК пуповины экспрессируют также такие матриксные белки как фибронектин, коллаген, которые создают благоприятное для роста эпителия микроокружение. Проведенные исследования показали, что МСК пуповины подавляют экспрессию провоспалительных факторов и медиаторов в очаге воспаления и таким образом блокируют хронический воспалительный процесс.

Проведенное клиническое исследование показало, что использование клеточной терапии аллогенными мезенхимальными стволовыми клетками пуповины человека является безопасным и эффективным методом в лечении хронических ран различного генеза.

Данное исследование проведено в рамках отраслевой программы «Новые клеточные технологии — медицине» (01.07.2002 — 01.07.2010), утвержденной 29.05.2002 на заседании президиума РАМН.

В.Л. Зорин^{1,2}, А.И. Зорина¹, В.Р. Черкасов¹,
П.Б. Копнин^{1,2}, Р.В. Деев¹, А.А. Исаев¹,
А.И. Неробеев³, Е.К. Кречина³, А.В. Аликова³,
В.Н. Мардахеева³, Ф.Н. Мустафина³,
А.В. Шилков⁴, С.В. Донецкая⁵

**Применение аутогенных фибробластов дермы
для коррекции возрастных изменений
кожи лица: год клинических наблюдений**

¹ Институт стволовых клеток человека, Москва,
Россия

² НИИ Канцерогенеза РОНЦ им Н.Н. Блохина РАМН,
Москва, Россия

³ ЦНИИ стоматологии и челюстно-лицевой хирургии,
Москва, Россия

⁴ Центр пластической и эндоскопической хирургии
«Ланцетъ», Москва, Россия

⁵ Клиника эстетической медицины «Лега Артис»,
Москва, Россия
doc_zorin@pisem.net

В основе старения кожи лежат фундаментальные молекулярные механизмы, ассоциированные с основной клеточной популяцией дермы — фибробластами. С возрастом в коже количество функционально-активных фибробластов снижается, уменьшается их биосинтетическая активность, нарушается баланс между процессами синтеза и деградации межклеточного матрикса, уменьшается содержание коллагена — основного структурного компонента дермы.

В общемировой практике эстетической медицины официально признано применение клеточных технологий, основанных на использовании аутогенных дермальных фибробластов: с июля 2010 г. применение технологии по использованию дермальных аутофибробластов для коррекции возрастных изменений кожи официально разрешено в России (технология «SPRS-терапия», ФСН№2009/308 от 21 июля 2010 г., Институт стволовых клеток человека); а с июля 2011 года — в США (технология LAVIV™, azficel-T, компания Fibrocell Science, Inc ранее Isolagen Technologies, Inc.).

Целью настоящего исследования стало обобщение накопленных данных и анализ результатов, характеризующих безопасность и эффективность технологии через 1 год после применения у 17 пациентов в возрасте 45-65 лет. Особый интерес представляет получение объективных знаний о длительности синтетической активности трансплантированных дермальных аутофибробластов и механизмах качественных и количественных изменений, происходящих в коже человека после их применения.

Для выделения клеток выполняли биопсию кожи из заушной области. Клеточный препарат получали в соответствии с медицинской технологией; вводили пациентам двукратно с интервалом месяц по 60×10^6 клеток тоннельным способом. Измерения результатов (оптическая профилометрия, кутометрия, лазерная доплеровская флоуметрия, комплексный клинический анализ состояния кожи, гистологическое исследование) проводили в параорбитальной, щечной и околоротовой областях исходно, через 1, 3, 6 и 12 месяцев после второй процедуры интрадермального введения аутофибробластов кожи.

Результаты исследований. Исследование глубины морщин методом оптической профилометрии

продемонстрировало прогрессирующее уменьшение глубины морщин во всех зонах измерения и через год в среднем составило: в параорбитальной области — 97%, в щечной — 94, в околоротовой — 62% по сравнению с исходным уровнем.

Исследование эластичности кожи лица методом кутометрии показало прогрессирующее улучшение показателей во всех точках измерения, при этом максимальное увеличение эластичности кожи отмечено в параорбитальной области, где через 6 мес. она превысила исходное значение на 25%, после чего сохранялась практически на этом же уровне в течение всего периода наблюдения.

Исследование кожи, выполненное методом лазерной доплеровской флоуметрии, выявило усиление гемомикроциркуляции (в среднем на 20% по сравнению с исходным уровнем) и увеличение активности гемодинамических механизмов регуляции тканевого кровотока (увеличение вазомоторной активности микрососудов в среднем на 50-55% по сравнению с исходным уровнем).

Комплексный клинический анализ состояния кожи лица с помощью фотометрического комплекса VISIA выявил прогрессирующее улучшение текстуры кожи лица после проведенного лечения (в среднем на 27% по сравнению с исходным уровнем) и уменьшение количества морщин (в среднем на 46% по сравнению с исходным уровнем).

Гистологическое исследование биоптатов кожи продемонстрировало: культивированные аутофибробласты в областях введения сохраняются в течение не менее 12 мес.; при этом отмечается пролонгированная синтетическая активность, выражающаяся в синтезе молодых (аргиروفильных) коллагеновых волокон, приводящая к утолщению дермы, признаком чего является изменение среднего расстояния между придатками кожи (в течение года увеличение толщины дермы — в среднем на 63% по сравнению с исходным уровнем). Иммуногистохимическая оценка состояния кожи показала: трансплантированные клетки не пролиферируют и не претерпевают патологической дифференцировки в миофибробласты.

Выводы. Полученные результаты наблюдений свидетельствуют о безопасности и клинической эффективности применения аутофибробластов дермы для коррекции возрастных изменений кожи. После трансплантации в кожу биосинтетические потенциалы культивированных аутофибробластов сохраняются, и они в течение не менее 12 месяцев активно продуцируют компоненты межклеточного матрикса дермы. В результате наблюдается ремоделирование микроструктуры дермы, сопровождающееся увеличением содержания коллагеновых волокон и толщины дермы, усилением функциональной гемомикроциркуляции, что клинически выражается увеличением тургора и толщины кожи, уменьшением количества и глубины морщин.

V.L. Zorin ^{1,2}, A.I. Zorina ¹, V.R. Cherkasov ¹,
P.B. Kopnin ^{1,2}, R.V. Deev ¹, A.A. Isaev ¹,
A.I. Nerobeev ³, E.K. Krechina ³, A.V. Alikova ³,
V.N. Mardahaeva ³, F.N. Mustaphina ³, A.V. Shilkov ⁴,
S.V. Donetskaya ⁵

**Application of autologous dermal fibroblasts
for correction of age-related changes of skin:
the year of clinical observations**

¹Human Stem Cells Institute, Moscow, Russia

² Research Institute of carcinogenesis,
named by N.N. Blohin RAMS, Moscow, Russia

³ Central Research Institute of Oral and Maxillofacial
Surgery, Moscow, Russia

⁴ Center for Plastic and Endoscopic Surgery «LANCET»,
Moscow, Russia

⁵ Clinic of Aesthetic Medicine «Lege Artis»,
Moscow, Russia

Basic molecular mechanisms, associated with the main cell population of the dermis – fibroblasts, are the basis of skin aging. The number of functionally active fibroblasts in the skin decreases, their bio-synthetic activity is being reduced, imbalance between the processes of synthesis and degradation of extracellular matrix, collagen – the main structural component of the dermis, -content decreases with age.

In the global practice of Aesthetic medicine using of cellular technology, based on using of autologous dermal fibroblasts: application of technologies of using dermal autofibroblasts to correct age related skin changes is allowed in Russia since July 2010 (technology «SPRS – therapy», FS № 2009/308 from July, 21st 2010, Human Stem Cells Institute) and in the USA since July 2011 (LAVIVTM, azficel-T, Fibrocell Science company, Inc., earlier Isolagen Technologies, Inc.).

The purpose of this research was the generation of accumulated data and analysis of results, which characterized the safety and effectiveness of technology in a year after application of 17 patients, aged 45-65 years. A special interest is to obtain objective knowledge about duration of a synthetic activity of transplanted dermal autofibroblasts and mechanisms of qualitative and quantitative changes, occurring in human skin after their application.

Skin biopsies performed BTE area for isolation cells. Cell preparation was obtained in accordance with the medical technology; patients were injected twice with an interval of a month for 60×10⁶ cells with tunneling method's helping. Measurement of results (an optical profilometry, a kutometry, a laser Doppler flowmetry, a comprehensive analysis of the clinical condition of the skin, histological examination) was carried out in para-orbital, buccal, and perioral areas initially, in 1, 3, 6 and 12 months after the second procedure of intradermal injection of skin's autofibroblasts.

Results of the researches. *Study of wrinkles' depth by optical profilometry* have shown a progressive decrease of wrinkles' depth in all areas of measurement, and at average after the year these rates were: in the paraorbital area – 97%, in the buccal area – 94%, in the perioral area – 62%, compared with baseline.

Study of the elasticity of face's skin by kutometry have shown progressive improvement in all points of study, while the maximum increase of elasticity of the skin was noted in the paraorbital area, where after 6 months it exceeded the reference value by 25%,

and then almost remained throughout the observation period at the same level.

Study of the skin, made by Laser Doppler flowmetry, revealed increase of hemomicrocirculation (at average by 20% compared with baseline) and increase of activity of the hemodynamic mechanisms of tissue blood flow regulation (increase of vasomotor activity of microvessels at average by 50% compared with baseline).

Comprehensive clinical analysis of skin, made by photometric complex VISIA, showed a progressive improvement in the texture of facial skin after treatment (at average by 20% compared with baseline) and reduction of wrinkles (at average by 46% compared with baseline).

Histological examination of biopsy specimens of the skin showed: autofibroblasts cultured in the areas of administration persist for at least 12 months; while prolonged synthetic activity is noted, which is expressed in the synthesis of young (argyrophilic) collagen fibers, and which leads to the thickening of the dermis, and the changes in the average distance between skin appendages are the signs of this synthesis (within one year increase in the thickness of the dermis at average by 63% compared with baseline). Immunohistochemical assessment of the skin showed: transplanted cells do not proliferate and do not undergo abnormal differentiation into myofibroblasts.

Conclusion. Obtained results of observing demonstrate the safety and clinical effectiveness of application of dermis autofibroblasts for correction of age-related changes of the skin. After transplantation of cultured autofibroblasts in the skin their bio-synthetic potential is saved, and they produce extracellular matrix component of the dermis for at least 12 months. As a result remodeling of the dermis microstructures is observed, which accompanied by an increase of collagen content and thickness of the dermis, and by increase of functional hemomicrocirculation, what is clinically expressed by increase of turgor and thickness of the skin, and by decrease in the number and depth of wrinkles.

Д.А. Зубов¹, А.С. Мовчан²

**Биотехнологические аспекты
выделения и культивирования хондроцитов
из пульпозного ядра межпозвонкового диска
и их функциональные характеристики
в культуре**

¹ Институт генетической и регенеративной
медицины НАМН Украины, Киев, Украина

² Национальная медицинская академия
последипломного образования им. П.Л. Шупика,
Киев, Украина
zoubov77@yahoo.com

D.A. Zubov, A.S. Movchan

**Biotechnological aspects of isolation
and culturing of the intervertebral disc
Nucleus pulposus chondrocytes and their
functional properties in culture**

Целью исследования является оптимизация получения и культивирования хондроцитов (ХЦ) пульпозного ядра межпозвонкового диска (МД) для разработки технологии наращивания терапевтически

значимого количества клеток для задач клеточной терапии при грыжах МД.

Методы исследования: культура клеток, цитохимический, гистохимический, кинетика роста, КОЕ-анализ, статистический.

Во время операции секвестрэктомии при грыжах поясничных межпозвонковых дисков получены биоптаты пульпозного ядра МД, из которых методом ферментативной дезагрегации выделяли ХЦ. Культуру ХЦ вели до 9 пассажа (DMEM/F12, 10% плодной коровьей сыворотки, Sigma-Aldrich, США), при этом изучалась кинетика роста популяций культивированных клеток, находящихся в фазе логарифмического роста. Выявлено, что число клеточных удвоений (количество случаев репликации) в популяции составило $n = 3,2$, время удвоения $t = 54$ ч., при условии, что общее время культивирования составило $T = 174 \pm 15,1$ ч. При КОЕ-анализе (100 клеток/90 мм чашку Петри, 14 сут.) эффективность посева ХЦ на 4-м пассаже составила 38%.

В связи с явлением дедифференцировки ХЦ *in vitro* и приобретением ими катаболического паттерна жизнедеятельности и выявлением сходства культуры с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), нами были проведены дифференцировочные тесты для ММСК по трем ортодоксальным направлениям. После 21 сут. инкубации в соответствующих дифференцировочных средах были получены остециты (положительная окраска культуры ализариновым красным на минерализованный матрикс); адипоциты (положительная окраска культуры на липидные вакуоли жировым красным) и формирование хондроидов в микромасс-культуре (положительная окраска криосрезов толудиновым синим/тетраборнокислым натрием и сафранином).

В результате проведенных исследований была оптимизирована технология изоляции и *in vitro* экспансии ХЦ пульпозного ядра, а также изучены некоторые кинетические и функциональные характеристики данного типа клеток в культуре.

Р.Р. Исламов¹, А.А. Ризванов²,
А.П. Киясов^{1,3}

**Пятилетний опыт
доклинических исследований генетически
модифицированных мононуклеарных клеток
крови пуповины для терапии бокового
амиотрофического склероза**

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Банк стволовых клеток Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия
islamru@yahoo.com

R.R. Islamov, A.A. Rizvanov, A.P. Kiasov

**Five-year experience in preclinical research
of gene modified mononuclear fraction
of umbilical cord blood cells for treatment
of amyotrophic lateral sclerosis**

Пять лет назад в журнале «Клеточная трансплантология и тканевая инженерия» (2007; 2(3): 21-37) нами была впервые сформулирована гипотеза о том, что доставку терапевтического гена в нервную ткань

можно эффективно осуществлять с помощью генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови, одновременно экспрессирующих терапевтический ген и ген молекулы адгезии нервных клеток. Экспрессия гена молекулы адгезии нейронов в генетически модифицированных клетках усилит их способность к адресной миграции и выживаемость в нервной ткани, а, следовательно, увеличится продолжительность действия терапевтического гена на нервные клетки.

Настоящее доклиническое исследование является научным поиском новых генных, клеточных и генно-клеточных лекарственных средств для регенеративной медицины в рамках Федеральной Целевой Программы Министерства образования и науки РФ по приоритетному направлению «Живые системы». В 2003 году в Казанском государственном медицинском университете (КГМУ) был создан банк стволовых клеток, а в 2005 году КГМУ получил лицензию Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию № 99-01-001961 на «применение новых клеточных технологий в здравоохранении».

В рамках выполнения этих проектов на основе плазмидного вектора pcDNA3.1 нами получены генетические конструкции, экспрессирующие различные гены человека: эритропоэтина (pcDNA-EPO), антиапоптозного белка (pcDNA-Bcl2), нейрональной молекулы адгезии L1 (pcDNA-hL1CAM), сосудистого эндотелиального фактора роста (pcDNA-VEGF121, pcDNA-VEGF165, pcDNA-VEGF189), фактора роста фибробластов (pcDNA-FGF2), глиального нейротрофического фактора (pcDNA-GDNF), нейроглобина (pcDNA-NG). Для повышения эффективности доставки комбинаций терапевтических генов в клетки-мишени на основе двухкассетной экспрессионной плазмиды pBud CE4.1 были впервые получены плазмиды pBud-VEGF-L1CAM, FGF2-L1CAM, VEGF-FGF2, VEGF-GDNF, GDNF-FGF2, которые позволяют одновременно и независимо продуцировать две разные терапевтические молекулы. Для генных конструкций pBud-VEGF-FGF2 и pBud-VEGF-GDNF получены два патента РФ на изобретение. В настоящее время совместно с ФГБУ «НИИЗМ им. Н.Ф. Гамалеи в лаборатории старшего научного сотрудника к.б.н. М.М. Шмарова ведутся работы по созданию экспрессионных векторов на основе адено-ассоциированного вируса.

Для доклинических испытаний новых лекарственных средств нами выбрана биологическая модель бокового амиотрофического склероза. Линия мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J создана в лаборатории Mark E. Gurney при Северозападном университете США (Northwestern University, USA). Трансгенные мыши G93A экспрессируют мутантный ген человека — Cu/Zn-супероксиддисмутазу SOD1 (Gly93→Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93). Мыши характеризуются прогрессирующей дегенерацией мотонейронов, как при боковом амиотрофическом склерозе человека. В результате необратимой дегенерации холинергических нейронов спинного мозга и ствола головного мозга животные умирают на фоне прогрессирования паралича скелетных мышц. В питомник лабораторных животных «Пушино» при филиале института биоорганической химии им. академика М.М. Шемякина и академика Ю.А. Овчинникова РАН (филиал ИБХ РАН) линия B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J поступила в 2006 году из питомника

The Jackson Laboratory (США) на средства по государственному контракту № 02.442.11.7319 (2006-PI-19.0/001/320). По договору с КГМУ питомник «Пушино» отвечает за поддержание линии и производство трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A) dl1Gur/J. Ветеринарное свидетельство, выданное SPF-сертифицированным питомником лабораторных животных «Пушино», подтверждает качество полученных животных и их пригодность для экспериментальных исследований. Генотипирование животных осуществляется в лаборатории молекулярной иммунологии ИМБ РАН им. В.А. Энгельгардта под руководством д.б.н. Купраша Д.В.

По результатам наших исследований можно сделать следующие выводы. Мононуклеарные клетки пуповинной крови способны проникать через гематоэнцефалический барьер. Терапевтические молекулы, транзитивно сверхэкспрессируемые генетически модифицированными клетками, могут влиять на клетки-мишени по аутокринному, паракринному или эндокринному механизму. Целесообразность генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови обусловлена: 1) повышением жизнеспособности трансплантированных клеток в тканях реципиента; 2) адресной доставкой специфических ростовых и трофических факторов в область дегенерации; 3) направленной дифференцировкой трансплантированных клеток в разные паренхиматозные клетки (макрофаги, эндотелиальные клетки, астроциты и др.).

В настоящее время проведение научных исследований финансируется за счёт государственного контракта ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2101 (ИРР).

М.Н. Катина¹, З.Г. Хаятова¹, Ч.Ч. Эмене²,
Р.Ф. Масгутов³, Р.Ф. Гайфуллина¹, А.А. Ризванов²

Мультипотентная дифференцировка стволовых клеток из жировой ткани хомяков

¹ Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

³ Республиканская клиническая больница, Казань, Россия
Rizvanov@gmail.com

M.N. Katina, Z.G. Hayatova, C.C. Emene,
R.F. Masgutov, R.F. Gaifullina, A.A. Rizvanov

Multipotent differentiation of hamster adipose derived stem cells

Исследования в области клеточной терапии различных заболеваний — одно из наиболее перспективных направлений современной медицины и науки в целом. Однако, прежде чем какое-либо лекарственное средство или метод лечения войдёт в широкую врачебную практику, он должен пройти целый ряд клинических и доклинических исследований *in vitro* и *in vivo*. Сирийские, или золотистые, хомяки *Mesocricetus auratus* могут служить моделями целого ряда заболеваний человека. Это пятое по популярности лабораторные животные. Их частое использование обусловлено простотой содержания, быстрым размножением и развитием, рядом анатомических и физиологических особенностей. Такие особенности их иммунной системы, как высокая

чувствительность к вирусному онкогенезу, наличие иммунопривилегированных зачаточных мешков, необычные характеристики молекулы главного комплекса гистосовместимости и Т-клеток, делают этих животных незаменимыми при исследованиях в области иммунологии и онкологии. Также хомяки подвержены таким заболеваниям человека, как лейшманиоз, токсоплазмоз, сифилис, микоплазменная инфекция. Сирийские хомяки — единственные животные, у которых возможно развитие спонтанного тромбоза. Также на этих животных моделируется эпилепсия, кардиомиопатия, они являются недорогой и легко воспроизводимой моделью таких широко распространенных заболеваний, как атеросклероз, сахарный диабет и кариес. Однако мы не обнаружили литературных данных об исследовании стволовых клеток хомяков, что ограничивает разработку методов клеточной терапии вышеуказанных заболеваний.

Целью нашего исследования было получение, культивирование и исследование потенциала дифференцировки стволовых клеток из жировой ткани (СКЖТ) хомяков *M. auratus*.

Стромально-сосудистую фракцию клеток (ССФ) выделяли из подкожной жировой ткани хомяков инкубированием с коллагеназой краба и последующим центрифугированием. Клетки ССФ высевали на культуральный пластик в среде α -MEM с добавлением 10% сыворотки плодов коровы (FBS) и 1 нг/мл основного фактора роста фибробластов человека (FGF2). Не прикрепившиеся клетки удаляли через 48 ч. Для дифференцировки использовали клетки 3 пассажа, которые инкубировали со специальными дифференцировочными средами в течение 20 сут. со сменой питательных сред каждые 48 ч.

Для остеогенной дифференцировки использовали среду α -MEM с добавлением 100 нМ дексаметазона, 0,5 μ M 2-фосфата аскорбиновой кислоты. Начиная с 10 сут. инкубации в дифференцировочную и контрольную среды добавляли 0,2 μ M β -глицерофосфата. Образование кальцифицированных структур после 20 сут. дифференцировки проводили окраской по методу von Kossa.

Для индукции адипогенной дифференцировки использовали среду DMEM с добавлением 1 μ M дексаметазона, 100 μ M индометацина, 500 μ M 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX) и 10 μ g/ml инсулина. Начиная с 10 сут. среду заменили на поддерживающую, отличающуюся отсутствием дексаметазона, индометацина и IBMX. Жировые клетки после 20 сут. дифференцировки выявляли окрашиванием Oil Red O.

Для нейрогенной дифференцировки клетки высевали на пластик, покрытый поли-L-лизин. Использовали дифференцировочную среду NBM (Neural basal media) с добавлением 1% FBS, 5% лошадиной сыворотки, добавок N2 и B27, 10 мкг/мл трансферрина, 60 мкМ путресцина, 25 мкг/мл инсулина, 0,02 мкМ прогестерона, 0,5 мкМ ретиноевой кислоты и 10 нг/мл нейротрофического фактора мозга (BDNF). Нейрогенную дифференцировку клеток после 20 сут. инкубации подтверждали иммунофлуоресцентным методом по экспрессии нейральных маркеров (β 3-тубулин, глиофибрилярный кислый белок GFAP, нейрофиламент L).

Клетки, полученные из жировой ткани хомяка, имели фибробластоподобную морфологию. Интенсивное серо-коричневое окрашивание при реакции

von Kossa свидетельствовало о наличии массивных минеральных отложений в культурах клеток после остеогенной дифференцировки. Окрашивание с использованием Oil Red O выявило наличие небольшого количества клеток адипоцитоподобной морфологии с ядром, оттесненным на периферию, и крупными, окрашенными в красный цвет, липидными каплями. В контрольных группах клеток признаков адипогенной и остеогенной дифференцировки обнаружено не было. Показана высокая экспрессия нейтральных маркеров в культуре клеток, подвергнутых нейрогенной дифференцировке. Интересно, что некоторое количество положительно окрашенных клеток встречалось и в контрольной культуре.

Таким образом, впервые получены СКЖТ хомяка и показана их способность к мультипотентной дифференцировке. СКЖТ хомяка дифференцируются в клетки мезенхимного ряда (остеобласты и адипоциты), а также проходят трансдифференцировку в немезенхимном направлении, с образованием клеток, экспрессирующих нейтральные маркеры. Полученные данные свидетельствуют о том, что СКЖТ хомяков аналогичны по своим свойствам так называемым мезенхимным стволовым клеткам, полученных из жировой ткани других организмов (человек, мышь, крыса и др.).

М.З. Кауламбаева¹, Г.В. Федотовских²,
Б.А. Рамазанова², М.Б. Узбеков¹,
А.Б. Нурмухамбетова¹

Применение культур клеток фетальных ретиноцитов и нейроцитов для лечения диабетической ретинопатии в эксперименте

¹ Научно-производственное предприятие «Антиген»,
Астана, Республика Казахстан

² Национальный научный медицинский центр,
Астана, Республика Казахстан
marzan61z@mail.ru

M.Z. Kaulambaeva, G.V. Fedotovskih,
B.A. Ramazanova, M.B. Uzbekov,
A.B. Nurmuhambetova

The use of cell cultures of fetalretinocytes and neurocytes in the treatment of diabetic retinopathy in the experiment

Сахарный диабет является серьезной проблемой мирового масштаба. Одним из самых тяжелых осложнений сахарного диабета является диабетическая ретинопатия (ДР), характеризующая прогрессирующим ростом новообразованных сосудов, внутриглазными кровоизлияниями, фиброзом сетчатки и стекловидного тела, отслойкой сетчатки, атрофией зрительного нерва и приводящая к слепоте. Это создает серьезные медико-социальные проблемы для многих стран, так как применяемые методы медикаментозного лечения диабетической ретинопатии являются зачастую малоэффективными. Поэтому наибольший интерес представляет применение клеточных технологий для лечения диабетической ретинопатии.

Цель исследования: определить эффективность применения культур фетальных ретиноцитов (РТКр) и нейроцитов (НТКр) для лечения диабетической ретинопатии в эксперименте.

Материал и методы. Исследования проводили на кроликах (самцы) 15 голов с массой тела 3–4 кг, имеющих в анамнезе дитизиновый диабет,

осложненный диабетической ретинопатией. В начале эксперимента трое кроликов были забиты для электронно-микроскопического исследования материала до лечения. Подопытные животные были разделены на две группы: 1) контрольная без лечения (шесть голов); 2) испытуемая, в правый глаз вводили суспензию клеток РТКр, в левый глаз суспензию клеток НТКр (шесть голов).

Для проведения эксперимента клетки ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации $4 \pm 0,5$ млн кл./см³. Суспензию клеток вводили инсулиновым шприцом в объеме 0,7 мл, то есть 2,8 млн клеток в область субтенонового пространства. Испытуемые и контрольные животные были забиты через 5 нед. после начала эксперимента. Материалом послужили 100 биопсийных кусочков сетчатки и сосудистой оболочки 20 глаз экспериментальных животных интактной, опытной и контрольной групп.

Результаты. При создании модели сахарного диабета с высоким уровнем содержания сахара в крови, в сетчатке и прилегающей к ней сосудистой оболочке глаз экспериментальных животных развивались морфологические признаки диабетической ретинопатии с тяжелыми изменениями сосудов микроциркуляторного русла, деструкцией клеток пигментного слоя, пролиферацией и миграцией пигментных клеток во внутренние слои сетчатки, деформацией наружных отделов фоторецепторных клеток, дистрофией нервных клеток всех ядерных слоев сетчатки.

Эффективная трансплантация культуральных ретино- и нейроцитов в субтеноновое пространство глаз экспериментальных животных на фоне диабетической ретинопатии со снижением уровня сахара в крови и визуальным улучшением картины глазного дна характеризовалась морфологически полноценным неоангиогенезом в хориокапиллярной пластинке сосудистой оболочки, восстановлением пигментного слоя и уменьшением дистрофических изменений в нервных клетках и окончаниях ядерных и сетчатых слоев сетчатки. Морфологическая картина восстановления структуры сетчатки глаз экспериментальных животных различными видами стволовых клеток была однотипной и не отличалась между собой.

Неэффективная трансплантация культуральных ретино- и нейроцитов в субтеноновое пространство глаз экспериментальных животных на фоне диабетической ретинопатии с сохраняющимся высоким уровнем сахара в крови и визуально отмеченной патологией глазного дна, характеризовалась морфологической картиной тяжелой диабетической ретинопатии с выраженным нарушением структуры сосудов микроциркуляторного русла, отеком, дистрофией и деструкцией всех ядерных и сетчатых слоев сетчатки.

В контрольной группе животных в сетчатке глаз мембрана Бруха была разрыхлена и утолщена. В хориокапиллярной пластинке крупные капилляры были резко расширены и полнокровны. Мелкие сосуды, расположенные вдоль мембраны Бруха, характеризовались полнокровием, деструкцией сосудистой стенки и паравазальными кровоизлияниями. Проллиферации пигментных клеток не отмечено. Наружные отделы палочек и колбочек деформированы. Часть биполярных клеток с признаками вакуольной дистрофии. Сеть нервных волокон, расположенных в сетчатых слоях сетчатки, характеризовалась признаками отека. Контуры ганглиозных клеток были нечеткими с явлениями гидропической дистрофии.

На основании полученных результатов эксперимента можно сделать заключение, что введение суспензии клеток фетальных нейроцитов и ретиноцитов субтеноновое пространство приводит к восстановлению и улучшению морфологического состояния сетчатки глаза в условиях компенсированного диабета.

Работа была выполнена по гранту научнотехнической программы «Инновационные технологии в развитии клеточных трансплантаций и восстановлении функциональной активности органов и тканей» АО Национального научного медицинского центра МЗ РК

Е.П. Киселева, Ю.М. Гаин

Эффективность использования комплексного трансплантата мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на гидрогелевой основе для восстановления целостности кожных покровов

Белорусская медицинская академия
последипломного образования, Минск,
Республика Беларусь
Kate_Kiselyova@mail.ru

E.P. Kiseleva, Y.M. Gain

Effects of hydrogel grafts combined with adipose mesenchymal stem cells on healing of full-thickness skin defects

Актуальность. В настоящее время при утрате структуры или функции органов все шире используются новые методы, основанные на применении клеточной трансплантологии и тканевой инженерии. Трансплантация тканеинженерных конструкций на основе резорбируемых матриц и выращенных *in vitro* мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) (ММСК) из жировой ткани (ЖТ) является одним из перспективных направлений для восстановления структурной и функциональной активности кожного покрова, утраченного вследствие широкого круга заболеваний и травм.

Цель работы: оценка эффективности применения комплексного трансплантата из аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, гидрогелей поливинилового спирта и природных полисахаридов, для восстановления целостности кожных покровов у лабораторных животных.

Материал и методы. Эксперимент выполняли на 24 белых беспородных крысах обоего пола массой 200–225 г. Исследование кинетики ранозаживления изучали на модели экспериментальных полнослойных ран. Площадь повреждения составляла не менее 10% от общей поверхности кожного покрова крысы.

Для получения ММСК у животных под внутримышечным наркозом в стерильных условиях получали жировую ткань в объеме, равном одному миллилитру. ММСК выделяли по стандартной методике с помощью обработки жировой ткани коллагеназой. Культивирование клеток проводили в CO_2 -инкубаторе при 37°C. ММСК 2–3 пассажей в концентрации не менее 1×10^5 на cm^2 засевали в культуральные чашки, содержащие плёнку гидрогеля. Замену среды проводили каждые третьи-четвертые сут.

Сформированы две экспериментальные группы по 12 особей в каждой: 1 группа животных

(опытная) — крысы с трансплантатом (гидрогель и аутогенные ММСК ЖТ); 2 группа (контрольная) — с заживлением ран посредством самостоятельной (не стимулированной) регенерации.

Подготовленные трансплантаты фиксировали к краям раны животных одиночными узловыми швами. В обеих группах на раны накладывали стерильные повязки. Животных размещали в индивидуальных клетках.

Для определения площади раневой поверхности её фотографировали с лимитированного расстояния цифровой фотокамерой, изображения переносили на компьютер, калибровали и измеряли площадь раневого поражения с помощью программы Scion Image (NIH, США).

Гистологическое исследование биоптатов кожи экспериментальных групп животных проводили на 10, 20 и 30 сут. после трансплантации. Достоверность различий между группами оценивали используя непараметрические методы статистики. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. По данным планиметрического, гистологического и визуального контроля за состоянием раны разница в скорости заживления наблюдалась уже на 5–7 сут. Площадь повреждённой поверхности в группе с применением трансплантата была достоверно меньше в размерах по сравнению с контрольной группой, где происходила спонтанная регенерация ($p < 0,05$).

При сравнительном морфологическом исследовании процесса заживления ран в группе животных с использованием трансплантата была выявлена достоверно более быстрая регенерация кожного покрова и уже к 21–23 сут. наблюдалась гистологическая картина, близкая к структуре субэпителиальных отделов нормальной кожи крыс

Выводы. В результате проведенного экспериментального исследования можно утверждать, что применение трансплантата, состоящего из гидрогелей поливинилового спирта, природных полисахаридов и аутологичных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани, следует рассматривать в качестве эффективного подхода для восстановления обширных дефектов кожного покрова.

Полученные данные свидетельствуют в пользу перспективности разработки и использования комплексных препаратов на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани и гидрогелей оптимального состава для эффективной регенерации повреждений кожи.

А.В. Ковалев, Н.П. Омеляненко

Тканевая инженерия кожи в контролируемых условиях водного окружения

ЦИТО им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия

A.B. Kovalyov, N.P. Omeljanenko

Tissue engineering of a skin in the supervised conditions of the water environment

Предложена стратегия поэтапного формирования матрично-клеточной тканеинженерной конструкции на раневой поверхности кожного покрова *in vivo* в управляемых условиях изолированной водной среды. Сегмент конечности с раневой поверхностью или частью тела погружается в специальное устройство, называемое «Регенератрон». В нем сочетают-

ся возможности управления составом и свойствами изолированной водной среды окружающей раневой участок кожи экспериментального животного и возможности культивирования и выращивания клеток, участвующих в построении репаративного тканевого регенерата.

А.Г. Коноплянников¹, М.А. Коноплянников²,
О.А. Коноплянникова¹

Комплексы кондиционной среды из под культур мезенхимальных стволовых клеток человека и животных с нанодиамазми как эффективные стимуляторы пулов стволовых клеток в системах клеточного обновления и новые агенты для профилактики или терапии острого лучевого поражения организма

¹ Медицинский радиологический научный центр Минздравсоцразвития РФ, Обнинск, Россия

² Российский государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия
konopl@mrrc.obninsk.ru

A.G. Konoplyannikov, O.A. Konoplyannikova,
M.A. Konoplyannikov

Complexes of conditioned medium from human and animal mesenchymal stem cells cultures with nanodiamonds as effective stimulators of stem cells pools in cell renewal systems and new agents for prophylactics or therapy of acute radiation damages of organism

Нанодиамазы размером 5–10 нанометров в настоящее время интенсивно изучаются как перспективные агенты для доставки противораковых препаратов в опухоли, хотя не исключаются и возможности использования нанодиамазов для доставки в нормальные ткани и других биологически активных соединений. В наших предварительных исследованиях на лабораторных животных (мыши и крысы) мы обнаружили, что пероральное введение 2% суспензии нанодиамазов со средним размером около 5 нанометров стимулирует у них восстановление кроветворения после сублетального облучения (аппарат «Луч», γ -лучи ^{60}Co , мощность дозы около 50 сГр/мин.). Можно было предположить, что введенные в организм нанодиамазы могут накапливаться в «нишах» стволовых кроветворных клеток и каким-то, пока неизвестным образом, стимулировать их пролиферацию. Мы попытались усилить наблюдаемый эффект стимуляции стволовых кроветворных клеток введением за одни сутки до γ -облучения мышам-гибридам F1(CBA $\times$ C57Bl/6) суспензии, в которой содержались комплексы нанодиамазов и кондиционной среды (КС) из под культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) (ММСК) мышей или человека. Методом селезеночных эндоколоний, а также по показателям восстановления клеточности костного мозга и периферической крови у сублетально и летально облученных мышей было показано, что пероральное введение комплексов нанодиамазов и КС из под культур аллогенных и ксеногенных ММСК значительно активизирует пул стволовых кроветворных

клеток, подобно тому, как это наблюдается при введении животным перед облучением радиопротекторов с «биологическим механизмом противолучевой защиты» (таких как липополисахариды, фактор некроза опухоли и др.). Радиозащитный и радиотерапевтический эффект введения мышам комплексов нанодиамазов и КС был выявлен также по тесту 30-дневной выживаемости летально облученных мышей и КС, причем не было больших различий в эффективности при использовании КС как из аллогенных культур ММСК, так и из ксеногенных культур ММСК. Следует отметить, что защитный и терапевтический эффекты комплексов нанодиамазов и КС по своей величине значительно превышают соответствующие эффекты отдельных компонентов комплексов.

Аналогичный эффект стимулирующего действия перорально вводимых комплексов нанодиамазов и КС также был выявлен нами по тесту продукции «микрореконий» стволовыми клетками кишечного эпителия у летально облученных мышей и по тесту выживаемости животных в период развития «кишечной формы» радиационной смертности (4–6 сут. после облучения).

Таким образом, комплексы нанодиамазов и КС из под культур ММСК являются эффективными стимуляторами пулов стволовых клеток в системах клеточного обновления организма и могут использоваться в качестве весьма перспективных агентов для профилактики и лечения лучевых поражений. Перспективным выглядит также использование таких стимуляторов для терапии повреждений, вызванных интенсивной химиотерапией, когда в значительной мере страдает пул стволовых кроветворных клеток и пул стволовых клеток кишечного эпителия.

Еще одной актуальной научной задачей, на наш взгляд, является изучение возможных эффектов данных комплексов в ситуациях, когда необходима стимуляция пулов стволовых клеток в системах медленного клеточного обновления организма, особенно при различных по природе поражениях жизненно важных органов (сердца, легких и др.), с использованием в этом случае нерадиационных тестов, которые не могут прямо оценивать эффекты на уровне соответствующего пула стволовых клеток в поврежденных тканях, а могут характеризовать изменения в них интенсивности репаративных процессов.

А.В. Коротков, О.А. Сатонкина, О.Г. Макеев

Возможность ген-индуцированной трансдифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в гепатоцитоподобные клетки

Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург, Россия

ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
larim@mail.ru

A.V. Korotkov., O.A. Satonkina, O.G. Makeev

The possibility of gene induced transdifferentiation of multipotent mesenchymal stromal cells into hepatocyte like cells

Печеночная недостаточность до сих пор относится к тем патологиям, при которых трансплантация органа остается наиболее результативным методом.

Современные разработки направлены на поиск путей повышения эффективности и доступности способов заместительной терапии. Известны успешные попытки внесения генов, кодирующих специфические сигнальные белки, в печеночные клетки *in vivo*. Однако эффективность и селективность такой трансфекции крайне мала. В свою очередь, трансплантация пациентам трансфицированных *in vitro* гепатоцитов не сопровождается сколько-нибудь значимыми эффектами. При этом векторы на основе вирусов хотя и демонстрируют лучшие результаты, однако имеют ограниченное клиническое применение вследствие высокой вероятности их интеграции в клеточный геном.

С другой стороны, известны попытки применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), сопровождавшиеся, в ряде случаев, хорошим клиническим эффектом. Более того, рядом исследований продемонстрирована способность ММСК дифференцироваться в клетки отличных от мезодермы зародышевых листков.

В данной работе сделана попытка направленной трансдифференцировки ММСК жировой ткани человека в гепатоциты путем их трансфекции эпигеномным вектором, содержащим фактор роста гепатоцитов.

Материалы и методы. В качестве вектора нами использован рBABE-puro HGP (Addgene plasmid 176). ММСК получали из жировой ткани здоровых добровольцев с их информированного согласия. Культивируемые клетки снимали с пластика 0,25% раствором трипсина (Sigma, США) и помещали в шестилучные планшеты. По достижении 70% конfluence контрольные клетки продолжали инкубировать в среде DMEM с добавлением 10% FBS и антибиотиков (Sigma, США), а клетки в опытных планшетах трансфицировали рBABE-puro HGP, проводили селекцию по устойчивости к пуromицину и культивировали в среде DMEM с добавлением 10% FBS, 10 нг/мл FGF-4, 100 ед/мл пенициллина и 100 ед/мл стрептомицина. Смену среды производили каждые 3 сут. Заменяемую среду хранили при – 20°C.

Результаты. Было показано, что в опытной группе синтез культивируемыми клетками альфафетопротейна и глюкоза-6 фосфатазы начинался с 14 сут. после трансфекции, тирозинаминотрансферазы — с 24 сут. Синтез цитокератинов, альбумина и триптофан-2,3 диоксигеназы отмечался с первых суток после трансфекции и плавно нарастал с течением времени, в то время как в нетрансфицированных клетках образования альфафетопротейна, тирозинаминотрансферазы и глюкоза-6 фосфатазы не наблюдалось.

Синтез цитохрома P450 проявился спустя 3 нед. после трансфицирования, а ядерного фактора гепатоцитов, наличие которого характерно для печени взрослых, — через 6 нед. после трансфекции.

Также через 6 нед. трансдифференцированные ММСК демонстрировали способность метаболизировать пентоксирезофурин, накапливать гликоген и продуцировать мочевину.

Таким образом, полученные клетки обладают некоторыми известными признаками гепатоцитов. Процедура получения клеток с признаками гепатоцитов из ММСК технологична и позволяет контролировать их свойства.

Доступность ММСК и их способность к экспансии *in vitro* дает основания рассматривать полученные

клетки в качестве перспективного средства для их клинического применения с целью терапии печеночной недостаточности.

Т.И. Кузьмина, Д.А. Новичкова, Н.О. Новикова

Партеногенетическое развитие растущих и завершивших фазу роста ооцитов коров

*Всероссийский Научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, Санкт-Петербург – Пушкин, Россия
prof.kouzmina@mail.ru*

T.I. Kuzmina, D.A. Novichkova, N.O. Novikova

Parthenogenic development of growing and fully grown bovine oocytes

Актуальность. Партеногенез млекопитающих — информативная модель для решения ряда актуальных задач генетики развития и экспериментальной эмбриологии. У млекопитающих описан как спонтанный (Кузьмина, 1990), так и индуцированный партеногенез (Lagutina I. et al., 2004). Известны случаи рождения живого потомства у мышей (Tomohiro Kono et al., 2004). В настоящее время партеногенетические зародыши сельскохозяйственных животных на стадии бластоцисты получены у свиней, коров, лошадей. Жизнеспособность партеногенетических эмбрионов низкая. Выявление факторов, влияющих на потенции ооцита к партеногенезу, создаст возможность направленного получения гаплоидных или диплоидных зародышей. Плюрипотентные эмбриональные стволовые клетки, полученные из партеногенетических зародышей млекопитающих, могут служить источником гистосовместимых тканей для трансплантации.

Цель исследования: сравнить компетентность к партеногенетическому развитию растущих и завершивших фазу роста ооцитов.

Материал и методы. Использование красителя BCB (brillant cresyl blue — бриллиантовый кристаллический голубой) позволяет тестировать растущие и завершившие стадию роста ооциты. BCB — vitalный краситель, детерминирующий активность дегидрогеназы (G6PDH). Фермент G6PDH активен в растущих ооцитах, однако, в завершивших стадию роста клетках снижает свою активность (Rodriguez-Gonzalez et al., 2002). BCB — тест основан на способности G6PDH конвертировать окраску BCB из голубой в бесцветную в растущих ооцитах, а в цитоплазме завершивших стадию роста ооцитах BCB не теряет цвет. Объектом исследования служили ооцит-кумуляные комплексы (ОКК) из антральных фолликулов яичников коров, овариоэктомизированных на мясокомбинате. Для проведения BCB-теста ОКК подвергали воздействию BCB (B-5388, Sigma, США), растворенном в растворе Дюльбекко с добавлением 0,4% бычьего сывороточного альбумина, в концентрации 26 mM при экспозиции 90 мин. По истечении времени воздействия BCB ОКК разделяли на две группы: ооциты с голубой окраской цитоплазмы, определяли, как BCB⁺ — ооциты, завершившие фазу роста с неокрашенной ооплазмой, как BCB⁻ — растущие. Ооциты культивировали в среде TC-199 с 10% фетальной бычьей сыворотки (Sigma, США), 50 нг/мл бычьего пролактина (Институт химии гормонов, Москва), совместно с клетками гранулезы

(106 кл./мл). Индукцию ооцитов к партеногенетическому развитию проводили холодовым шоком на стадии метафаза-I (через 18 часов после начала культивирования) (Эрнст Л.К., Кузьмина Т.И. и др., Патент №1086808, 1983). Отбор дробящихся зародышей проводили через 28 часов после активации, дальнейшее культивирование эмбрионов осуществляли в синтетической среде SOF (Sigma, США). Апоптоз в бластомерах полученных эмбрионов определяли методом TUNEL. Зародыши помещали на poly-L-lysine-предметные стекла, фиксировали в растворе формалина, промывали в PBS (Sigma, США), помещали на 2 мин. в 10% раствор Тритона X-100 на 0,1% цитрате натрия, отмывали в PBS (Sigma, США) и добавляли Kit from Boehringer Mannheim Cat. No 1684795. Инкубировали в темноте в течение 60 мин. при 37°C. Клетки промывали 3 раза в PBS и окрашивали пропидиум иодидом (50 мкг/мл) после обработки РНК-азой (50 мкг/мл) в течение 60 мин. при комнатной температуре. Уровень апоптоза подсчитывали с помощью люминесцентного микроскопа. Признак апоптоза — конденсированный хроматин.

Результаты и обсуждение. Популяция донорских ооцитов, выделяемых из антральных фолликулов яичников коров, для их использования в клеточных технологиях репродукции неоднородна. Качество ооцитов зависит от размера фолликула, его тургора, степени васкуляризации, числа слоев кумулюсных клеток, окружающих ооцит, от морфологии ооцита. Ранее нами выявлена гетерогенность исходной популяции ооцитов коров, выделенных из фолликулов разного диаметра по BCB-тесту. Доля BCB⁺ ооцитов, обнаруженных в фолликулах диаметром меньше 3 мм, 3–5 мм и более 5 мм составила, соответственно — 58%, 79% и 70%. Показано, что BCB⁺ ооциты имеют высокие потенции к дальнейшему оплодотворению и развитию из них эмбрионов на стадии бластоцисты (Heleil B., Kuzmina T., 2010). В настоящем исследовании оценивались потенции к партеногенетическому развитию растущих и завершивших фазу роста ооцитов. Активации к партеногенезу подверглись 240 ооцитов, 160, оцененных как BCB⁺ и 80, как BCB⁻. Выявлены низкие потенции к партеногенетическому развитию BCB⁻ ооцитов коров, так, уровень партеногенов в этой группе составил 15% против 75% в группе BCB⁺ ооцитов ($P < 0,001$). Партеногены, развившиеся из BCB⁻ ооцитов, не достигали стадий 8-16 — клеточных эмбрионов. Из BCB⁺ ооцитов выход партеногенетических 8–16-клеточных зародышей составил 60% (75 эмбрионов из 125). Из них стадии бластоцисты достигли 4 зародыша. Апоптозные изменения в бластомерах отмечены у 33 из 69 8-16-клеточных партеногенов (48%).

Заключение. В целом, результаты исследований свидетельствуют о высокой эффективности использования BCB-диагностики для раннего прогнозирования потенций исходной популяции ооцитов коров к партеногенетическому развитию и возможности получения из них партеногенетических эмбрионов на стадии бластоцисты.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект офи-а 10-04-00389).

И.В. Майбородин, В.В. Морозов, Я.В. Новикова, В.А. Матвеева

Восстановление тканевого кровотока у крыс после введения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в тромбированную вену

Центр новых медицинских технологий
Института химической биологии
и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия
imai@mail.ru

I.V. Maiborodin, V.V. Morozov, Ja.V. Novikova,
V.A. Matveeva

The restoration of tissue blood current at rats after introduction of mesenchymal stem cell into thrombosed vein

Актуальность. Профилактика и лечение тромбозов является одной из острейших и наиболее значимых проблем современной медицины во всем мире. Около 30% пациентов, перенесших тромбоз какого либо сосуда, погибают в ближайший месяц, а еще у 20% в течение 3 мес. развивается рецидив заболевания. Литература содержит только косвенные данные о возможности применения стволовых клеток для реканализации тромбированных сосудов или ускоренного роста коллатералей в ишемизированных тканях, но отсутствуют результаты исследований, четко доказывающие рост сосудов в тканевом регионе тромбоза после введения мультипотентных стволовых клеток.

В связи с вышеизложенным была поставлена **цель исследования** — установить возможность применения аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) костномозгового происхождения (АММСК КМ) для восстановления нарушенного кровообращения в тканях крыс.

Материал и методика. В качестве модели были использованы самцы крыс линии Wag весом 180–200 г возрастом 6 мес. Все исследования проводили с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных», все манипуляции осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом.

АММСК КМ 2 пассажа, полученные от крысы указанной линии, трансфицировали ДНК плазмиды pEGFP-N1, содержащей ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Суспензию АМСККП вводили непосредственно в тромбированную по методу S. Wessler и соавт. v. femorales. Животных выводили из эксперимента через 4 сут., 1, 2, 3, 4 и 5 нед. после введения АММСК КМ. V. femorales с окружающими тканями фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере, обезжизняли в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин, неокрашенные срезы изучали на световом микроскопе в режиме люминесценции.

Результаты исследования. При моделировании тромбоза v. femorales произошло формирование тромбов в мелких ветвях этого сосуда, проходящих в толще мышц бедра. К 4 сут. после введения АММСК КМ в просвете сосудов, в паравазальной клетчатке и в тканях между сосудами были найдены единичные, небольшие, часто овальные, специфически светя-

щиеся объекты, наиболее вероятно — сосуды, прорастающие через тромб в просвете сосуда (канализация тромба), и сосуды, формирующиеся рядом с тромбированными для осуществления коллатерального кровотока.

Через 1 нед. после операции иногда было отмечено специфическое свечение стенок в мелких сосудах, проходящих между мышечными волокнами, однако признаков тромбоза в таких сосудах уже отмечено не было. Вместе с этим в межфасцикулярных пространствах поперечно-полосатой мышечной ткани присутствовало множество кровеносных сосудов с облитерированным просветом, причем облитерация часто была полной. Клетки в тканях на месте этих сосудов имели признаки кариопикноза и кариорексиса.

Спустя 2 нед. в массиве мышц бедра были найдены сосуды венозного типа с ярким свечением в стенке. Число таких сосудов со специфическим свечением значительно возросло, они встречались практически у каждого животного и неоднократно. Иногда в таких мелких сосудах присутствовали остаточные явления тромбоза, и если в ряде случаев свечение в их стенке было гомогенным, то при внимательном изучении видны более темные клеточные ядра и ярко светящаяся цитоплазма клеток, причем не только в эндотелии, но и в других оболочках.

На более поздние сроки сосуды со специфическим свечением в стенке, расположенные в мышечном массиве бедра, отсутствовали.

Обсуждение полученных данных. После введения тромбина в *v. femorales*, он присутствует не только в самом сосуде, но и распространяется ретроградно (вследствие перевязки магистрали и нарушения оттока) на ее ветви. В результате этого происходит тромбирование не только магистральной вены, но и ее более мелких ветвей. Далее в мелких сосудах фибрин организуется, что часто приводит к облитерации просвета такого сосуда. Затем или рядом развиваются новые сосуды или происходит реканализация тромбированного сосуда. Учитывая появление все большего числа сосудов венозного типа с ярким свечением в стенке в массиве бедренных мышц к сроку в 2 нед. после тромбоза и введения АММСК КМ, можно заключить, что восстановление кровотока в регионе тромбированной вены максимально на данный срок.

Заключение. Восстановление тканевого кровотока в регионе тромбированной магистральной вены происходит или через канализацию тромба или через облитерацию тромбированных сосудов и прорастание новых. АММСК КМ участвуют в обоих этих процессах, что приводит к более быстрому восстановлению кровотока в тканевом микрорайоне пораженной вены.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Исследование генных и клеточных подходов в терапии заболеваний сердечно-сосудистой системы или опорно-двигательного аппарата» (ГК16.512.11.2099 «Исследование возможности использования генных и клеточных подходов в диагностике, профилактике и лечении тромбозомболических осложнений сердечно-сосудистых заболеваний для снижения уровня смертности и ранней инвалидизации трудоспособного населения РФ»).

О.Г. Макеев, А.В. Коротков, Е.А. Шуман

Эффективная индукция плюрипотентных стволовых клеток

Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург, Россия

ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия

larim@mail.ru

O.G. Makeev, A.V. Korotkov, E.A. Shuman

Effective induction of pluripotent stem cells

Возможность практического использования индуцированных плюрипотентных клеток (иПК) предусматривает решение двух основных проблем: проблему низкой эффективности репрограммирования, обычно не превышающей долей процента, и проблему прогнозирования побочных эффектов интеграции векторов в клеточный геном. Решение второй проблемы может лежать в области применения эпигеномных векторов, однако их использование еще больше снижает эффективность трансфекции. Означенное требует разработки новых векторов, протоколов трансфекции и выбора клеток, репрограммирование которых будет наиболее успешным. Конструкции новых эпигеномных векторов включают в себя локусы ДНК вирусов для усиления экспрессии целевых генов и модифицированные участки ORI для подавления репликации плазмиды в эукариотической клетке, ограничивающие продолжительность экспрессии вносимого в клетку гена (генов). Известная из литературы вариативность эффективности трансфекции позволяет предполагать существование достаточно короткого временного диапазона в жизненном цикле клетки, когда такое репрограммирование становится возможным. Если это так, тогда неоднократное трансфицирование способно повысить вероятность совпадения определенного этапа жизненного цикла клетки и достаточной для трансфицирования концентрации вектора в культуре. Можно также предполагать, что наиболее удовлетворяющими характеристиками гипотетического объекта репрограммирования являются мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани (ММСК), благодаря признакам «стволовости» и беспрепятственности их получения и наращивания. Вполне логичным представляется объединение всех перечисленных подходов.

Тем самым целью настоящего исследования явилось изучение эффективности репрограммирования адипозных ММСК человека с использованием вектора нового поколения в условиях многократной трансфекции.

В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 с добавлением заменителя сыворотки, смеси неэссенциальных аминокислот, L-глутамина и фактора роста фибробластов (Sigma, США). Для получения иПК, свободных от постороннего генетического материала, нами были использованы плазмиды с заменой стандартного плазмидного ORI на oriP/ EBNA1, так как вектор с таким участком инициации репликации полностью исчезает у 95% трансфицированных клеток спустя 4 нед. культивирования. Гены факторов транскрипции OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, и KLF4 с «открытой» рамкой считывания получены путем прямой ПЦР ДНК эмбриональных стволовых клеток человека. В качестве промотора транскрипции был использован ген SV40

LT, полученный из плазмиды pBABE-puro SV40 LT (Addgene, США), ген hTERT (энхансер) клонирован из плазмиды pBABE-hygro-hTERT (Addgene, США). Сайты инициации трансляции IRES1 и IRES 2 были заимствованы из плазмид pIRESpuro3 и pIRES2EGFP соответственно (Clontech, США). В качестве стоп-кодона был использован фрагмент F2A вируса ящура, синтезированный химически на ДНК синтезаторе ASM 800. Полученные гены были вставлены в вектор pCER4 (Invitrogen, США) и клонированы в *E. coli* штамме DHF α (Fermentas, США).

Для репрограммирования векторы факторов транскрипции были контрансфицированы в ММСК. Спустя 5 часов культивирования при 37°C в CO₂-инкубаторе, трансфицирующую смесь удаляли и заменяли на культуральную среду. Спустя 18 часов процедуру трансфекции повторяли. Цикл — трансфекция-инкубация-трансфекция выполняли трижды.

Выделение эписомной ДНК из иПК проводили с использованием наборов QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, США) и протеинкиназы K (Sigma, США). Геномную ДНК выделяли по традиционному протоколу (фенол/хлороформ). Реакцию проводили с использованием rfx-ДНК полимеразы и ~0,1 мг геномной или эписомной ДНК. В качестве негативного контроля использовали геномную и эписомную ДНК из нетрансфицированных клеток.

При трансфицировании ММСК, полученных из жировой ткани здоровых добровольцев, векторами новой конструкции по описанному протоколу эффективность репрограммирования оказалась существенно выше, чем при использовании стандартного протокола трансфекции (221,88+/-38,28 колоний или 2,24+/-0,77% по сравнению с 118,20 +/- 38,28 колоний или 1,14 +/- 0,77% по стандартному протоколу $p = 0,97$). Спустя 4 нед. в полученных иПК не удалось выявить ДНК вектора или его кодирующих участков. В условиях *in vitro* показана способность полученных иПК дифференцироваться в клетки трех зародышевых листков.

В.Д. Макушин, Т.А. Ступина, М.А. Степанов

Возможности костномозговой стимуляции регенерации суставного хряща при дегенеративно-дистрофическом процессе (экспериментально-клиническое исследование)

РНЦ ВТО им. Г. А. Илизарова, Курган, Россия
office@ilizarov.ru

V.D. Makushin, T.A. Stupina, M.A. Stepanov

Stimulation Potential of Cells-and-Tissue Therapy for Articular Cartilage Regeneration in Degenerative and Dystrophic Process (Experimental and clinical study)

В настоящее время среди способов стимуляции репаративного остео- и хондрогенеза широкое распространение получили: субхондральная туннелизация, абразия и формирование микропереломов субхондральной кости, объединенные названием — «костномозговая стимуляция». По данным Д.А. Маланова (2002) лучшие исходы по эффективности восстановления суставной поверхности наблюдаются после субхондральной туннелизации. Согласно данным литературы (Otto W.R., Rao J., 2004; Kotobuki N. et al., 2004) в настоящее время внимание ортопе-

дов привлекается к использованию аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) при лечении остеоартрозов.

С целью оценки эффективности применения костномозговой стимуляции репаративного хондрогенеза при субхондральном туннелировании, моделировали остеоартроз (МОА) путем пересечения бедренной артерии с последующей иммобилизацией обоих коленных суставов (период иммобилизации — 28 сут.). После окончания иммобилизации 6 животных выводили из опыта. Остальным 10 животным через 8 сут. после МОА на правом суставе туннелировали субхондральную зону с введением в каналы костномозговой суспензии, взятой из проксимального метафиза плечевой кости. Левый сустав не туннелировали. Животных выводили из опыта через 22, 36 и 98 сут. после МОА. Парафиновые срезы мышечков бедра окрашивали альциановым синим (АС) при pH 1,0 (реакция на сульфатированные гликозаминогликаны — сГАГ). Методом рентгеновского электронно-зондового микроанализа определяли концентрацию серы (ω S) — маркера сГАГ. Морфометрия проведена по полутонким срезам, окрашенным по Уикли. В качестве контроля морфометрировали суставной хрящ интактных животных ($n = 5$). Цифровой материал анализировали в программе «Microsoft Excel».

Проанализированы результаты лечения 25 пациентов в возрасте от 41 до 72 лет с гетерогенным гонартрозом методом внесуставной туннелизации субхондральных зон и костномозговой стимуляцией (Патент №2363408 РФ).

Результаты. При МОА в суставном хряще выявлены очаги разволокнения. Во всех зонах резко редуцировано количество клеток. Реакция на сГАГ существенно ослаблена. Выявлено снижение ω S до $0,70 \pm 0,02$ вес.% (в контроле — $1,2 \pm 0,02$ вес.%). Наблюдалось уменьшение толщины (h) хряща — $318,6 \pm 2,72$ мкм (в контроле — $475,5 \pm 1,35$ мкм). Выявлены разрывы базофильной линии, проникновение костномозгового паннуса. В субхондральной зоне отмечено разрежение костных трабекул, наблюдалась агрегация эритроцитов, стаз сосудов микроциркуляторного русла. Выявленные морфологические изменения соответствуют ранним стадиям остеоартроза — степень 1–3 (Гистологическая классификация Международного общества изучения остеоартроза OARSI, 2006). Через 22 сут. после МОА в хряще левых суставов сохранялось разволокнение межклеточного вещества, большая часть хондроцитов находилась в состоянии деструкции. Репаративная регенерация выражалась увеличением количества клеток и незначительным увеличением ω S ($0,81 \pm 0,025$ вес.%) относительно МОА. С увеличением срока эксперимента деструктивные изменения прогрессировали. Увеличение пустых лакун на фоне уменьшения содержания сГАГ, свидетельствовало о срыве компенсаторных возможностей хряща. Закономерным выглядело снижение h хряща — $326,6 \pm 6,32$ мкм. В суставном хряще туннелированных суставов через 22 сут. после МОА отмечено уменьшение размеров и частоты встречаемости очагов разволокнения. В субхондральной зоне в очагах активного ремоделирования наблюдалось образование густой сети молодых трабекул, межбалочные промежутки заполнены красным костным мозгом. Через 36 и 98 сут. после МОА

в большей части наблюдений очаги разволокнения отсутствовали. Увеличивалось число изогенных групп и секреторно-активных клеток, которые характеризовались выраженной гипертрофией. Наблюдалось увеличение ωS ($0,9 \pm 0,02$ вес.%) и интенсивности окрашивания межклеточного вещества АС, прирост h хряща — $465,8 \pm 4,45$ мкм. Целостность базофильной линии не нарушена. В субхондральной зоне выявлены функционирующие капилляры, что обуславливало позитивное трофическое влияние на гиалиновый хрящ. Наличие пролиферации в сочетании с увеличением размеров хондроцитов, содержанием сГАГ могут быть расценены как реактивные изменения, за счет которых осуществлялась репаративная регенерация хряща.

Клиническое применение указанной методики с использованием костномозговой суспензии, взятой из костномозговой полости большеберцовой кости, показало высокую позитивную анатомо-функциональную эффективность с удлинением ремиссионного периода до 5 лет. Анализ результатов лечения показал, что туннелирование в сочетании с костномозговой стимуляцией на 25–30% в сравнении только с туннелизацией суставных отделов повышает эффективность реабилитации больных гонартрозом.

Таким образом, на основании полученных результатов исследования способ субхондральной туннелизации с введением в каналы костномозговой суспензии можно рассматривать как перспективный в плане стимуляции репаративной регенерации хряща.

Работа выполнена по плану НИР ФГБУ «РНЦ «ВТО» имени академика Г.А. Илизарова» Минздравсоцразвития России, № государственной регистрации 01201155769.

А.Д. Мартынова, В.Д. Шевченко, О.В. Бондарь,
Т.И. Абдуллин

**Доставка плазмидной ДНК
в составе комплекса с поликатионом
и блоксополимером этиленоксида
и пропиленоксида**

Казанский (Приволжский) федеральный
университет,
Казань, Россия
martalina007@gmail.com

A.D. Martynova, V.D. Shevchenko, O.V. Bondar,
T.I. Abdullin

**Delivery of plasmid DNA in the complex with
polycation and block copolymer of ethylene
oxide and propylene oxide**

Разработка эффективных и безопасных систем доставки невирусных генов в клетки является актуальной задачей для биологии и медицины. Низкая эффективность невирусных генных препаратов в условиях *in vivo* обусловлена, в частности, их ферментативным гидролизом и низкой скоростью проникновения в клетку. Применение катионных полимеров, конденсирующих нуклеиновые кислоты, уменьшает их деградацию и способствует трансфекции, однако, получаемые при этом комплексы характеризуются повышенной токсичностью и невысокой эффективностью *in vivo*.

Нами исследована возможность усиления доставки в клетки человека плазмидной ДНК (пДНК) в комплексе с ПЭИ в присутствии трехфункциональных амфифильных блоксополимеров этиленоксида и

пропиленоксида марки Лапрол. На культурах клеток (3Т3 фибробласты, фибробласты и мультипотентные стромальные клетки человека и др.) установлено, что ПЭИ в связывающей ДНК концентрации характеризуется значительно меньшей эффективностью трансфекции пДНК, чем препарат TurboFect™.

По данным динамического светорассеяния полиплекс на основе препарата TurboFect обладает большим положительным зарядом, меньшими размером и полидисперсностью, чем полиплекс на основе ПЭИ. Оба полиплекса проявляют цитотоксичность в рабочей концентрации. Добавление к комплексу пДНК–ПЭИ Лапрола в нетоксичной концентрации приводило к существенному повышению количества трансфицированных клеток в культуре. Предполагаемый механизм действия Лапрола связан с облегчением внутриклеточной доставки пДНК и ее высвобождения из лизосом.

Результаты представляют интерес для разработки новых полимерных материалов для доставки невирусных генов.

С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, О.В. Кожевников,
В.К. Ильина, А.В. Иванов

**Возможности клеточных технологий
при лечении врожденных ложных суставов
костей голени у детей**

ЦИТО им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия
Omel156@yandex.ru

S.P. Mironov, N.P. Omel'yanenko, O.V. Kozhevnikov,
V.K. Il'ina, A.V. Ivanov

**Features of cellular technologies in the
treatment of congenital pseudarthrosis
of shin bones in children**

Актуальность. Лечение врожденных ложных суставов костей голени у детей является сложной задачей. До настоящего времени не решен ряд важных вопросов лечебной тактики у этих пациентов, а именно выбор вида хирургической коррекции, способа остеосинтеза. Использование костнопластических материалов, а также возможности алло и аутопластики, а также перспективы клеточных технологий у пациентов этой группы diskutabelny. Частота рецидивов врожденного ложного сустава остается высокой и достигает 47–50%.

Цель исследования. Разработка современной технологии лечения врожденных ложных суставов на основе использования аутогенных стромальных клеток костного мозга.

Материал и методы. В период с 2006 по 2011 гг. проведено лечение врожденных ложных суставов большеберцовой кости у четырех пациентов в возрасте от 1,4 до 9 лет. По классификации Crawford: с IV типом — 3 пациента, один из них с нейрофиброматозом, со II типом — 1 пациент, ранее неоднократно оперирован. При обращении в клинику у него отмечена выраженная угловая деформация большеберцовой кости (до 90 градусов). В основу хирургической коррекции положена классическая методика компрессионно-дистракционного остеосинтеза по Г.А. Илизарову. Пациентам выполняли резекцию зоны ложного сустава с последующим наложением внешней конструкции. Оперативное вмешательство было дополнено трепанбиопсией крыла подвздошной кости с захватом столбика ткани 4×10 мм.

Из биоптата выделяли клеточную суспензию костного мозга для культивирования «in vitro». Культивирование проводили по стандартной методике. Через 25–30 сут. осуществляли первую аутотрансплантацию. Культивированные аутогенные стромальные клетки костного мозга (СККМ) вводили в область резекции ложного сустава инъекционно в 1 мл физиологического раствора. Курс состоял из 3–5 инъекций с интервалом в 3–8 дней. Показания к демонтажу аппарата определяли на основании клинико-рентгенологического исследования с выполнением стандартных рентгенограмм сегмента и компьютерной томографии области консолидации костных фрагментов.

Результаты. Рентгенологические признаки сращения были отмечены уже через 3 мес. после операции. Демонтаж аппарата осуществлен в период от 5 до 7,5 мес. После демонтажа аппарата 3 пациентам, в том числе с нейрофиброматозом, проведена коррекция неравенства длины конечностей за счет того же сегмента дистракционным методом. В течение пятилетнего периода наблюдения за тремя пациентами рецидива ложного сустава не отмечено. У четвертого пациента (1,4 лет) через 3 мес. также отмечались признаки формирования костной мозоли, однако в течение 1 года после операции, по ряду признаков, полная консолидация так и не наступила. Хирургическая коррекция с курсом клеточной терапии была проведена повторно. В настоящее время (4 мес. после операции) отмечаются признаки идущей консолидации. Фиксация в аппарате и наблюдение за пациентом продолжаются.

Преимущества использования аутогенного клеточного материала в лечении врожденных ложных суставов очевидны. Среди них: отсутствие риска инфицирования, а также проблем этического и психологического характера, возникающих при использовании аллогенных материалов, отсутствие трансплантационных реакций и расширенного вмешательства по пластике дефекта, что часто бывает при аллопластике. Введение культивированных аутогенных стромальных клеток костного мозга после завершения стадии воспаления и начала собственного остеогенеза, оказывали стимулирующее воздействие, приводя к восстановлению поврежденной кости и дальнейшему сращению области резекции ложного сустава.

Выводы. Положительный опыт комплексного лечения, включающего классическую хирургическую методику и современную клеточную технологию, подтвердил перспективность выбранного нами направления в лечении врожденных ложных суставов у детей. Результаты исследования позволяют говорить о выраженном стимулирующем действии аутогенных стромальных клеток костного мозга на репаративную костную регенерацию, а отсутствие рецидивов в течение пятилетнего периода наблюдения свидетельствует о достижении стойкого клинического эффекта.

В.М. Михайлов¹, А.В. Соколова¹, В.В. Кравцова²,
В.В. Зенин¹, Е.В. Каминская¹, Тимонина²,
И.И. Кривой

Немиелоаблативная трансплантация костного мозга как способ восстановления синтеза дистрофина и функции нейромышечных синапсов мышечных волокон при миодистрофии мышей mdx

¹ Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский Государственный
Университет,
Санкт-Петербург, Россия
vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

V.M. Mikhailov, A.V. Sokolova, V.V. Kravtsova,
V.V. Zenin, E.V. Kaminskaya, N.A. Timonina,
I.I. Krivoi

Non myeloablative bone marrow stem cell transplantation as method for mdx mice reparation of dystrophin synthesis and of function of nerve-muscle junctions

Мыши mdx являются экспериментальной моделью неизлечимого моногенного заболевания — миодистрофии Дюшенна. Надежда на выздоровление при этом заболевании связана как с клеточной терапией, так и с использованием других молекулярно-клеточных воздействий. Анализ результатов, полученных при применении клеточной терапии, показывает, что внутримышечная трансплантация стволовых клеток различного происхождения не может стабильно конвертировать мутантные мышечные волокна (МВ) в мышечные волокна дикого типа. Это объясняется тем, что после выделения из костного мозга или других источников в организме и последующем культивировании, стволовые клетки теряют «стволовость». Был сделан вывод, что замена мутантного костного мозга на костный мозг дикого типа может заместить мутантные МВ в МВ дикого типа. Однако, у мышей mdx сингенная трансплантация костного мозга после летального облучения в дозах 5 и более Гр не сопровождается усилением синтеза дистрофина и последующей дифференцировкой в МВ дикого типа. Торможение синтеза дистрофина есть проявление торможения экспрессии гена дистрофина у ядер трансплантированных стволовых клеток в составе саркоплазмы облученных мышей mdx. Однако после немиелоаблативной трансплантации стволовых клеток костного мозга дикого типа мышам mdx при облучении лучами Рентгена в дозе 3 Гр мы наблюдали стабильный рост синтеза дистрофина, так что в период 6-ти месяцев после трансплантации доля дистрофин-положительных мышечных волокон возрастала от 1% до 27%. По имеющимся физиологическим критериям эта величина соответствует минимальному уровню синтеза дистрофина, позволяющего мышечной ткани функционировать (20% дистрофин-положительных МВ). Усиление синтеза дистрофина сопровождалось уменьшением гибели МВ до 0,7% и увеличением доли МВ без центральных ядер до 22%. Усиление дифференцировки МВ характеризовалось частичным восстановлением структуры нейромышечных синапсов. Электрофизиологические измерения показали, что в МВ диафрагмы после трансплантации костного мозга происходит восстановление мембранного потенциала покоя

синапсов от -75 mV до -81 mV и от -74 mV до -77 mV в участках мембран между синапсами. Гиперполяризация концевых пластинок нейро-мышечных синапсов также достигает нормальной величины $-3,7$ mV. В МВ диафрагмы также усиливался синтез дистрофина. В мазках костного мозга обнаружено 3% клеток донорского происхождения, что указывает на возникновение у реципиентов костного мозга мышей mdx химеризма. Полученные результаты указывают на возможность преодоления торможения синтеза дистрофина и дифференцировки МВ после проникновения в саркоплазму ядер трансплантированных клеток при немизлоаблативной трансплантации клеток костного мозга дикого типа.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Программы Молекулярно-Клеточная Биология РАН, гранта РФФИ 10-04-00970а и научно-исследовательского гранта Санкт-Петербургского Университета № 1.131.118.2011.

А.К. Наханов, Б.А. Сейдахметова, С.Т. Турсуналиев

Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга, в инсулин-продуцирующие клетки в условиях *in vitro*

РГП Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
пгт. Гвардейский Жамбылской области,
Республика Казахстан
aziz_nk@mail.ru

A.K. Nakhanov, B.A. Seidahmetova, S.T. Tursunaliyev

Differentiation of mesenchymal stem cells isolated from bone marrow into insulin-producing cells in condition of *in vitro*

В мире одним из наиболее распространенных заболеваний является сахарный диабет (СД). Недостатки современных методов лечения СД (инсулинотерапия и трансплантация островков поджелудочной железы) обуславливают поиск альтернативных источников бета-клеток.

Многочисленные исследования последних лет свидетельствуют о высоком дифференцировочном потенциале мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток) (ММСК) костного мозга. В нескольких исследованиях (Ianus A. et al. 2003; Moriscot C. et al., 2005; Oh S.-H. et al., 2004; Xiaobo X. et al., 2007; Hisanaga E. et al., 2008) показано, что клетки костного мозга *in vitro* и *in vivo* могут дифференцироваться с образованием клеток эндокринной части поджелудочной железы.

Целью работы было получение инсулин-продуцирующих клеток из ММСК костного мозга путем культивирования в специальных дифференцировочных средах.

Материал и методы. Костный мозг получали из берцовых костей беспородных самцов мышей путем вымывания физиологическим раствором. Исследования ММСК на наличие поверхностных антигенов CD105, CD73, CD90, CD 45/14, CD34, CD117, CD 19 и CD16 проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur с использованием моноклональных антител производства Miltenyi Biotec.

Индукцию дифференцировки ММСК в инсулин-продуцирующие клетки (ИПК) проводили тремя методами:

- с использованием среды, содержащей трихостатин А;
- трехэтапный протокол с использованием сред, содержащих β -меркаптоэтанол, основной фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, β -целлюлин, активин А и никотинамид;
- индукция с помощью высоких концентраций глюкозы.

Индукцию дифференцировки ММСК в инсулин-продуцирующие клетки регистрировали по образованию трехмерных клеточных кластеров, содержащих внутриклеточного цинка (окраска дитизоном) количеству С-пептида в питательной среде (ИФА), экспрессии генетического маркера PDX-1 иммунофлуоресцентным методом. Определение продукции инсулина проводили с использованием иммуноферментного тест-набора BioSource INS-EASIA. В качестве положительного контроля использовали культуры островков Лангерганса поджелудочной железы мыши.

Результаты. Клеточные популяции из костного мозга после культивирования положительно окрашивались антителами на следующие антигены: CD10 — 84%, CD13 — 97,7%, CD44 — 97,1%, CD90 — 97,2%, CD105 — 97,7% и были отрицательны по маркерам гемопоэтических клеток — CD34, CD45, CD117, CD14, CD34, CD 19 и CD16.

При культивировании ММСК с трихостатином А и в среде с повышенной концентрацией глюкозы (25 ммоль) образование островкоподобных клеточных кластеров наблюдали на 5 сут., где максимального числа и размеров они достигали на 12–14 сут. Размеры клеточных кластеров на 5 сут. достигали размеров 50–100 мкм и на 14 сут. увеличивались до 300 мкм. После 10 сут. культивирования клеточные кластеры начинали приобретать трехмерную морфологию, схожую с панкреатическими островками. Клетки позитивные на дитизон и экспрессирующие PDX-1 составляли 2–5% от образованных кластеров.

При применении трехэтапного протокола дифференцировки островкоподобные клеточные кластеры начинали образовываться на 7–8 сут. культивирования, после проведения всех этапов обработки. По мере увеличения сроков культивирования, количество и размеры клеточных кластеров увеличивалось в 1,5–2 раза. При этом способе количество кластеров, окрашивающих на дитизон и экспрессирующих PDX-1, составляло 2–15%.

Культивирование ММСК в питательной среде DMEM в сочетании с повышенной концентрацией глюкозы также дало положительные результаты. Формирование клеточных кластеров наблюдалось на 3–4 нед. культивирования. Позитивные на дитизон и PDX-1 составили 5–15%.

Содержание инсулина в средах, на которых культивировались ИПК, определяли с использованием иммуноферментного тест-набора BioSource INS-EASIA (Бельгия). В результате было определено, что содержание вырабатываемого инсулина в среде составляет от 20 до 50 μ IU/мл. Так в среде, в которой ММСК культивировались согласно первой методике, уровень инсулина составил 26–42 μ IU/мл, в среде, в которой клетки культивировались по трехэтапному протоколу, уровень инсулина составил 31–46 μ IU/мл

и в среде повышенной концентрацией глюкозы уровень инсулина составил 21–34 $\mu\text{U}/\text{мл}$.

Обсуждение результатов и выводы. ММСК могут быть дифференцированы в ИПК в условиях влияния различных индукционных сред. В результате проведенных работ было установлено, что неотъемлемым звеном в процессе дифференцировки является высокий уровень глюкозы в среде (25 ммоль). Другие же вещества являются ускорителями процесса дифференцировки. Кроме того, при определении инсулин-продуцирующей активности островкоподобных образований из ММСК было установлено, что продукция инсулина меньше в 2–3 раза по сравнению с островками из поджелудочной железы.

Нгуен Тхи Чанг

Исследование ассоциации полиморфных генов-кандидатов ишемической болезни сердца с развитием окислительного стресса у лиц пожилого и старческого возраста Ростовской области

Южный федеральный университет,
Ростов-на-Дону, Россия
trangtrang@yandex.ru

Nguyen Thi Trang

Research of association of polymorphic markers of genes-candidates of ischemic heart disease with development of oxidative stress in the persons of elderly and senile age living in the Rostov region

В XXI веке медико-биологические исследования с участием пожилых, старых людей и долгожителей признаны ООН необходимыми для выявления факторов, маркеров риска и подходов к адекватной терапии возраст-ассоциированных заболеваний, разработки стратегии увеличения продолжительности жизни и улучшения ее качества в пожилом и старческом возрастах, поиска предикторов потенциального возраста дожития, а также для развития фундаментальных представлений о самом феномене старения. Исходя из этого данная научно-исследовательская работа представляет интерес как в теоретическом, так и прикладном аспектах.

Целью работы являлось исследование интенсивности системы свободно-радикального окисления крови, показателей структурно-функционального состояния мембран эритроцитов и распределения частот генотипов и аллелей полиморфных локусов генов-кандидатов у больных ишемической болезнью сердца в группах лиц пожилого и старческого возраста, проживающих в Ростовской области.

Материал и методы исследования. Использование биофизических (Хемилюминесцентного анализа в системе H_2O_2 — люминол для определения интенсивности свободных радикалов, латеральная диффузия гидрофобного зонда пирена для определения функционального состояния мембраны эритроцитов), биохимических (определение интенсивности молекулярных продуктов перекисного окисления липидов, активности антиоксидантных ферментов и антиоксидантных белков и структурной организации мембран эритроцитов по показателям внеэритроцитарного гемоглобина и суммарной пероксидарной активности), генетических методов (анализ полиморфизмов генов-кандидатов T174M и M235T гена

AGT; L28P гена APOE; C3238G гена APOC3; L33P гена ITGB3; C807T гена ITGA2; C786T гена eNOS и Q192R гена PON1 ишемической болезни сердца) и методов статистической обработки результатов исследования (Т-Стюдента, хи-квадрат, отношение шансов при доверительном интервале 95%). Экспериментальные данные получены в 3 возрастных группах пациентов больных ишемической болезнью сердца (300 человек) и когорте здоровых доноров (300 человек): 1 группа — пациенты в возрасте 30–44 лет (зрелый возраст); 2 группа — пациенты в возрасте 45–59 лет (средний возраст); 3 группа — пациенты в возрасте 60–89 лет (пожилой и старческий возраст).

Результаты. При развитии ишемической болезни сердца у лиц пожилого и старческого возраста, проживающих в Ростовской области, повышается скорость продукции активированных форм кислорода, уровень метаболитов оксида азота, интенсивность процессов перекисного окисления липидов в плазме крови и эритроцитах, снижается активность супероксиддисмутазы, каталазы в эритроцитах и увеличивается оксидазная активность церулоплазмина в плазме крови, нарушение стабильности и структурной организации мембран эритроцитов усиливается с возрастом и характеризуется повышением микровязкости липидного бислоя, текучести зон белок-липидных контактов, увеличением уровня структурных перестроек мембранных белков и повышением полярности внутренних гидрофобных областей мембраны эритроцитов.

Обнаружено, что у жителей пожилого и старческого возраста манифестация ишемической болезни сердца ассоциирована с полиморфными маркерами T174M гена ангиотензиногена (AGT); L33P гена рецептора интегрин бета 3 (ITGB3); L28P гена аполипопротеина E (APOE); C3238G гена аполипопротеина C3 (APOC3) и C786T гена эндотелиальной синтазы окси азота (eNOS). Чаще встречается сочетание двух и более полиморфных аллелей в гетерозиготном состоянии генотипов: в 66% случаев — AGT M235T/eNOS C786T; в 32% — AGT T174M/eNOS C786T/ITGB3 L33P; в 11% — AGT M235T/APOC3 C3238G/eNOS C786T/PON1 Q192R; в 9% — AGT M235T/APOE L28P/eNOS C786T/ITGB3 L33P, и в гомозиготном состоянии — в 16% случаев — AGT M235T/eNOS T786C.

Выявленные полиморфизмы в генах, регулирующих гемостаз и эндотелиальную функцию — T174M гена AGT, L33P гена ITGB3, L28P гена APOE, C3238G гена APOC3 и C786T гена eNOS — у больных ишемической болезнью сердца пожилого и старческого возраста ассоциируются с развитием окислительного стресса и нарушением структурного гомеостаза мембран эритроцитов.

Выводы. Выявленные полиморфные маркеры в генах-кандидатах, регулирующих гемостаз и эндотелиальную функцию и ассоциированных с ишемической болезнью сердца в группе пожилого и старческого возраста Ростовской популяции, являются предикторами нарушения свободнорадикального и структурного (на примере мембран эритроцитов) гомеостаза, что приводит к развитию окислительного стресса.

Д.О. Омельченко, А.А. Ржанинова, И.А. Федюнина,
Е.Е. Кириенко, Д.В. Гольдштейн

**Цитогенетическое исследование клеточных
линий спонтанно immortalized перицитов
из ММСК разных тканей человека**

Медико-генетический научный центр РАМН,
Москва, Россия
omdeno@gmail.com

D.O. Omelchenko, A.A. Rzhninova, I.A. Fedunina,
E.E. Kirienko, D.V. Goldshtein

**Cytogenetic analysis of spontaneously
immortalized pericyte cell lines from
multipotent mesenchymal stromal cells (MMSC)
of different human tissues**

Генетическая стабильность стволовых клеток, выделяемых для использования в медицинских целях — важный и интересующий многих ученых вопрос. На данный момент в литературе есть сведения о возможности спонтанной трансформации ММСК, однако данных о том, какая именно субпопуляция в гетерогенной популяции ММСК претерпевает трансформацию, нет.

По разработанному в нашей лаборатории протоколу из стандартной культуры ММСК жировой ткани здоровых доноров (2 мужчин — BL29, KR30 и 4 женщин — VA18, VO21, PU28, BB25), пупочного канатика (TF1) и печени эмбриона (S359) были получены клетки, несущие характерные маркеры перицитов (основные из которых CD146⁺ CD140b⁺ и CD31⁺) особой популяция мультимпотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК), обладающая широким дифференцировочным потенциалом.

Часть клеток претерпела спонтанную трансформацию уже на первых пассажах после выделения. Из этих клеток были получены 8 линий спонтанно immortalized ММСК, которые сохранили характерный для перицитов иммунофенотип. В данной работе представлен цитогенетический анализ данных линий как часть их всестороннего исследования.

Из популяций клеточных линий и популяций, полученных из отдельных клонов этих линий, были получены рутинно окрашенные препараты (окраска азур-эозином) и исследованы с помощью световой микроскопии. Для каждой популяции было проанализировано 30–50 метафазных пластинок. Анализ данных был проведен методами описательной и непараметрической статистики. Все результаты были посчитаны при уровне значимости $p < 0,05$.

Исследованные линии обладают сложным кариотипом. Гетерогенность хромосомного набора клеток свидетельствует о серьезных нарушениях аппарата деления. Число хромосом в большинстве случаев попадает в диапазон от 65 до 100 хромосом на клетку. Чаще всего наблюдался гипо-тетраплоидный хромосомный набор. Это позволяет предположить, что данный хромосомный набор возник в результате произошедшего при трансформации эндомитоза и неравного расхождения хромосом в последующих делениях. Во всех популяциях редко встречаются сильные отклонения в виде гигантских многоядерных клеток, хромосомный набор которых приближается к 160 хромосомам на клетку, кроме популяции клона KR30_5, где подобный хромосомный набор является нормой.

В среднем в каждой популяции 31,4% клеток, несущих aberrantные хромосомы. Из них 49,4% aberrаций это полицентрики (дидцентрики, трицентрики и т.д.), 30,1% двойные микрохромосомы, 18,2% другие хромосомные и хроматидные aberrации, 2,1% кольцевые хромосомы. Характерные массовые хромосомные aberrации свидетельствуют о протекании «Break-Fusion-Bridge» цикла в клетках, характерного для некоторых видов плеоморфных опухолей.

Набор хромосом клеточных линий, полученных от разных доноров, статистически значимо различается. Дисперсионный анализ Краскела-Уоллиса показал статистически значимые различия между исходными общими популяциями и примерно половиной популяций соответствующих дочерних клонов. Исключение — линия PU28, у которой выборка по всем клонам сходна с выборкой по общей популяции.

При статистическом анализе Хи-квадрат по площади хромосомного набора статистически значимо близкими к тетраплоидному оказались популяции линий PU28, KR30 и BL29. При множественном попарном сравнении общих популяций линий также наблюдается сходство PU28, KR30 и BL29. Immortalized клетки данных популяций были получены из ММСК жировой ткани доноров младшего возраста, что позволяет предположить у них более гибкие механизмы стабилизации последствий нарушений, полученных клетками при трансформации, по сравнению с ММСК взрослых доноров.

М.П. Петрушко, Н.Н. Чуб, В.И. Пиняев, Е.Б. Ревенко,
А.А. Колесникова, И.В. Добрунова

**Использование криоконсервированных клеток
гранулезы и кумулюса яичников человека
для дозревания ооцитов in vitro**

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков, Украина

M.P. Petrushko, N.N. Tchoob, V.I. Pinajev,
E.B. Revenko, A.A. Kolesnikova, I.V. Dobrunova

**Use of cryopreserved cumulus and granulosa
cells of human ovarian for oocyte maturation
in vitro**

В настоящее время проведение программы оплодотворения in vitro (IVF) в естественном (натуральном) цикле является самой важной и актуальной задачей в репродуктивной медицине, т.к. избегается мощное гормональное воздействие на организм женщины. При выполнении данной программы получают один-два ооцита на стадии метафазы II (M II) или метафазы I (M I) мейоза. Ооциты на стадии M I имеют нечетко выраженную corona radiata, плотный скудный кумулюс, отсутствует полярное тельце. Совершенно очевидно, что для таких гамет необходимы специальные условия дозревания.

Целью данного исследования являлось создание условий для дозревания незрелых ооцитов in vitro, с помощью введения в среду культивирования криоконсервированных клеток гранулезы и кумулюса яичника человека.

Материал и методы. Материалом исследования служили клетки гранулезы и кумулюса (КГК), полученные из преовуляторных фолликулов яичника человека у женщин, которые проходили программу IVF, с их информированного письменного согласия. После помещения ооцит-кумулюсного комплекса

в условия культивирования, оставшиеся в фолликулярной жидкости КГК культивировали, криоконсервировали (Патент № 46451, 2009, Украина) и хранили при -196°C до использования. Мониторинг роста фолликулов, их аспирацию, этап культивирования гамет проводили по стандартной IVF-технологии. После сокультивирования с криоконсервированными КГК яйцеклетки, достигшие стадии MII, инсеминировали методом единичного введения спермия в цитоплазму ооцита. Через 16–18 часов культивирования регистрировали оплодотворение при наличии женского и мужского пронуклеусов. Морфофункциональные характеристики эмбрионов оценивали на протяжении 128 часов культивирования.

Результаты. Первую группу составили 30 ооцитов на стадии MI, которые культивировали в присутствии деконсервированных КГК в среде Menes B_2 . Контролем служили 28 ооцитов, которые перед созреванием освобождали от прилегающих клеток кумулюса с помощью раствора гиалуронидазы. Через 24 часа культивирования у $75 \pm 0,8\%$ ооцитов первой группы и $44 \pm 0,5\%$ ооцитов второй группы отмечали экструзию первого полярного тельца. Частота оплодотворения в первой группе составила $73,3 \pm 0,9\%$, во второй — $71,4 \pm 0,8\%$. Через 24 часа культивирования $81,8 \pm 0,7\%$ эмбрионов первой и $60,0 \pm 0,5\%$ эмбрионов второй группы находились на стадии 4 бластомеров. Количество морфологически нормальных эмбрионов (без фрагментации с четкими ровными бластомерами, без вакуолизации и зернистости цитоплазмы) составило $75,0 \pm 0,4\%$ и $72,0 \pm 0,5\%$, соответственно. Однако отмечается невысокая частота развития эмбрионов до стадии бластоцисты — $66,7 \pm 0,6\%$ — в первой и $50,0 \pm 0,5\%$ — во второй группе.

Выводы: 1) присутствие криоконсервированных КГК яйчника человека в питательной среде при культивировании незрелых ооцитов, способствует их созреванию до стадии MII *in vitro*, что, возможно, связано с продуцированием КГК гормонов и факторов роста в среду культивирования; 2) в группе ооцитов, с неудаленным кумулюсом, созревание, дробление и развитие эмбрионов статистически значимо выше, чем в группе с денудированным кумулюсом.

А.В.Поликарпова¹, А.А.Ризванов¹, К. Пелин²

Терапия немалиновой миопатии путем сплайсосо-зависимого транс-сплайсинга РНК

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Департамент биологии, университет Хельсинки, Финляндия
nasechkas@gmail.com

A.V. Polikarpova, A.A. Rizvanov, K. Pelin

The nemaline myopathy therapy by spliceosome-mediated RNA trans-splicing

Создание эффективных методов лечения мышечных дистрофий (в частности, немалиновой миопатии) является актуальной задачей современной биомедицины. Одним из новейших методов служит генная терапия, а именно технология SMART — сплайсосо-зависимый транс-сплайсинг РНК.

Цель исследования — разработка технологии лечения немалиновой миопатии с применением генной модификации клеток путем введения претрансплайсируемых молекул РНК (ПТМ).

Материал и методы. Выделяли ПТМ (экзоны 122–123) и часть гена небулина с мутантными локусами (экзоны 120–124, делеция в 122 экзоне, приводящая к терминации трансляции) из плазмиды pUC57, проводили рекомбинацию с плазмидой pcDNA3.1. Далее клонировали плазмиды со вставками в культуру клеток *E. coli*, осуществляли сбор рекомбинатных плазмид, используя селекцию по ампициллину и путем секвенирования. В качестве модельной клеточной культуры использовали культуру раковых клеток HeLa. Трансфицировали клетки HeLa, используя липидный комплекс MetaFectine, плазмидные ДНК со вставками участка гена NEB и ПТМ в соотношении 0,5:0,5, 0,5:1,0 и 0,5:1,5 соответственно. Контролем служили клетки, трансфицированные pcDNA3.1, содержащими NEB 120–124 mut, а также плацебо. После трансфекции клетки инкубировали в течение 24 часов в культуральной среде. Из части клеток выделяли РНК, путем обратной транскрипции получали кДНК, секвенировали или анализировали путем рестрикции (у NEB 120–124 mut имеется сайт рестрикции XbaI). На аналогично трансфицированных клетках проводили иммунофлуоресцентное окрашивание с помощью Anti-His (C-term)-FITC Antibody.

Результаты и обсуждение. В результате иммунофлуоресцентного окрашивания культуры клеток HeLa мы выявили NEB-позитивные трансфицированные клетки. Это в сочетании с данными рестрикционного анализа кДНК, полученной из клеток HeLa, подтверждает способность ПТМ замещать мутантные участки гена NEB (успешно трансплайсированные молекулы кДНК не подвергались действию рестриктазы XbaI). Следует отметить, что при окрашке клеток HeLa, трансфицированных одновременно ПТМ и NEB 120–124 mut, наблюдали характерные гранулы белкового продукта. При этом, наиболее выраженное увеличение количества гранул наблюдали при трансфекции NEB120–124 mut и ПТМ в соотношении 0,5:1,0.

Таким образом, трансфекция клеточной культуры плазмидной ДНК, содержащей ПТМ приводит к транс-сплайсингу ПТМ и NEB 120–124mut с образованием нормального белкового продукта, что может послужить основой терапии немалиновой миопатии.

А.А. Ризванов¹, А.А. Измайлов², З.З. Сафиуллов²,
Г.А. Шарифуллина², М.С. Калигин²,
В.В. Соловьева¹, И.И. Салафутдинов^{1,3},
И.Ю. Грибова⁴, И.Л. Тутыхина⁴, М.М. Шмаров⁴,
А.П. Киясов^{2,5}, Р.Р. Исламов²

Генно-клеточная терапия бокового амиотрофического склероза мононуклеарными клетками пуповинной крови человека, генетически модифицированными рекомбинантными аденовирусами

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия

³ Республиканская клиническая больница, Казань, Россия

⁴ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

⁵ Банк стволовых клеток ГБОУ ВПО Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия
Rizvanov@gmail.com

A.A. Rizvanov, A.A. Izmailov, Z.Z. Safiullov,
G.A. Sharifullina, M.S. Kaligin, V.V. Solovyova,
I.I. Salafutdinov, I.Yu. Gribova, I.L. Tutyhina,
M.M. Shmarov, A.P. Kiyasov, R.R. Islamov

Gene-cell therapy of amyotrophic lateral sclerosis using human umbilical cord blood mononuclear cells genetically modified with recombinant adenoviruses

Генетическая модификация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека (МК-ПК) в доклинических исследованиях повышает их терапевтическую эффективность при терапии различных нейродегенеративных заболеваний, которые сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Повышение эффективности клеточной терапии происходит, в первую очередь, за счет повышенной экспрессии терапевтических генов, например, гена сосудистого эндотелиального фактора роста человека *VEGF*, обладающего нейропротекторными, нейротрофическими и проангиогенными свойствами. В настоящее время перспективными для генной терапии считаются вирусные векторы. К таким векторам относятся репликационно-дефектные аденовирусы. Эти вирусы не способны интегрироваться в геном клетки-хозяина и вызывать её онкологическую трансформацию. В то же время аденовирусы способны обеспечивать эффективную экспрессию трансгенов в течение как минимум 4–5 нед. Немаловажно, что применение аденовирусов в контексте генно-клеточной терапии позволяет снизить иммуногенность вирусного вектора.

Цель исследования — получение МК-ПК, генетически модифицированных рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими гены зелёного флуоресцентного белка (Ad-GFP) или сосудистого эндотелиального фактора роста человека (Ad-VEGF121), и изучение их терапевтического эффекта на модели бокового амиотрофического склероза у трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный ген супероксид дисмутазы человека *sod1* G93A.

Материал и методы. Мононуклеарные клетки из пуповинной крови человека выделяли седимен-

тацией в градиенте плотности фиколла. До и после трансдукции МК-ПК рекомбинантными аденовирусами оценивали способность клеток к образованию колоний в метилцеллюлозной среде. Жизнеспособность и апоптоз клеток определяли окрашиванием пропидием йодидом и аннексином V соответственно. Иммунофенотип МК-ПК определяли по маркерам CD3, CD4, CD8, CD34 и CD45. Экспрессию мРНК гена *vegfr121* в клетках, трансдуцированных Ad-VEGF121, оценивали методом ПЦР в режиме реального времени. Экспрессию GFP оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии.

Через сутки после трансдукции, 2 млн генетически модифицированных МК-ПК трансплантировали путем инъекции в ретроорбитальное пространство трансгенных мышей. С помощью тестов «Открытое поле» и «Сила хватки» оценивали клиническое состояние мышей и терапевтический эффект трансплантированных клеток.

Результаты. Установлено, что генетическая модификация МК-ПК с помощью рекомбинантных аденовирусов Ad-GFP или Ad-VEGF121 не приводила к существенному изменению морфологии и жизнеспособности клеток по сравнению с нетрансдуцированными клетками *in vitro*. С помощью ПЦР в режиме реального времени показана эффективная транскрипция мРНК гена *vegfr121* в генетически модифицированных МК-ПК.

Животные были разделены на три группы: (1) трансплантация клеток, трансдуцированных Ad-VEGF121; (2) трансплантация клеток, трансдуцированных Ad-GFP; (3) инъекция физиологического раствора. Через 8 недель после трансплантации горизонтальная активность в первой группе снизилась на 24%, во второй — на 54%, в третьей — на 52%. На 11 неделе эксперимента горизонтальная активность понизилась у подопытных мышей на 48%, 78% и 89% соответственно. После 7 нед. со дня трансплантации генетически модифицированных клеток мышечная сила хватки у животных первой группы уменьшилась на 34%, во второй группе — на 63%, в третьей — на 74%. На 10 неделе трансплантации сила хватки продолжала снижаться на 60%, 84% и 95% соответственно. Следует также отметить, что животные после трансплантации генетически модифицированных клеток, трансдуцированных Ad-VEGF121, прожили в среднем на 2 нед. дольше, чем мыши, получившие инъекцию физиологического раствора.

Выводы. Трансдукция мононуклеарных клеток пуповинной крови человека рекомбинантными аденовирусами является эффективным способом генетической модификации для повышения их терапевтического потенциала при генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Выявленные различия между экспериментальными группами дают основания предположить, что генно-клеточная терапия, основанная на генетически модифицированных клетках пуповинной крови, экспрессирующих сосудистый эндотелиальный фактор роста, может быть эффективна для лечения бокового амиотрофического склероза.

В.А. Россиев¹, С.В. Макаров^{1,3}, Е.А. Корымасов²,
А.В. Казанцев², О.А. Торина¹, И.В. Макарова¹

**Применение клеточных технологий
в терапии аутоиммунной и соматической
патологии**

¹ Центр трансплантации костного мозга и клеточной
терапии ГБУЗ «Самарская областная клиническая
больница им. М.И. Калинина», Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский
университет, Самара, Россия

³ Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ»,
Самара, Россия
samara-ctbm@mail.ru, rossiev_v@mail.ru

V.A. Rossiev, S.V. Makarov, E.A. Korymasov,
A.V. Kazancev, O.A. Torina, I.V. Makarova

**The application of cellular technologies
in treatment of autoimmune and somatic
pathology**

Фундаментальные и прикладные исследования в области клеточных технологий, а также их развитие и внедрение в практическое здравоохранение является одним из приоритетных направлений современной медицины.

Цель исследования. Изучение эффективности и безопасности применения технологий на основе аутогенных стволовых кроветворных клеток при аутоиммунных заболеваниях и ангиосклерозе.

Материал и методы. В центре трансплантации костного мозга и клеточной терапии ГБУЗ «Самарская областная клиническая больница им. М.И. Калинина» министерства здравоохранения и социального развития Самарской области с 1999 года были проведены клинические исследования, связанные с применением аутогенных периферических стволовых кроветворных клеток (CD34⁺), при аутоиммунных заболеваниях (АЗ). Возраст 74 больных с рассеянным склерозом (РС) и 2-х с миастенией обоего пола составлял от 18 до 54 лет. Длительность заболевания колебалась от 3 до 25 лет, степень инвалидизации по шкале EDSS составляла от 3 до 8,5 баллов. Почти у 80% больных диагностировано вторично-прогрессирующее течение болезни. В группе пациентов с различным течением коллагеноза (ревматоидный артрит, системная красная волчанка) было 7 женщин и 3 мужчин в возрасте от 16 до 50 лет с длительностью болезни от 2 до 15 лет. При АЗ мобилизацию периферических стволовых кроветворных клеток (ПСКК) проводили препаратом Нейпоген. Для каждого пациента было заготовлено мононуклеаров с маркером CD34⁺ от 4,5 до 25,0×10⁶ кл./кг веса. Предтрансплантационное кондиционирование проводилось по протоколам: 1) ВЕАМ (кармустин, этопозид, цитозар, мельфалан) + АЛГ или антитимоцитарный глобулин и 2) флудара + мелфалан + АЛГ. Пациенты находились в стерильном боксе в течение 20–25 дней. У 42 мужчин в возрасте 57,0±1,8 лет с длительностью заболевания от 1 до 16 лет с дистальной формой облитерирующего атеросклероза артерий нижних конечностей (ОА), имеющих IIБ стадию заболевания по классификации А.В. Покровского, использовались аутогенные прогениторные клетки (CD 133⁺), выделенные из костного мозга с помощью магнитной сепарации (Тюмина О.В. и соавт. 2006). В группе больных с ОА проводилось рандомизированное двойное «слепое»

плацебо-контролируемое исследование и отсутствовала возможность выполнения реконструктивной операции. Полученный препарат со взвесью CD 133⁺ или без вводили в мышцы внутренней и внешней поверхности голени в 10 точек на каждой конечности, по 1,5 мл в каждую точку.

Результаты и выводы. Цель высокодозной иммуносупрессивной терапии с аутотрансплантацией стволовых кроветворных клеток (ВИСТ АТ) при АЗ состояла в репрограммировании иммунной системы с индукцией толерантности к аутоантигенам (А. Tyndall et al., 1999; А. Marmont, 2009), способной привести к длительной ремиссии за счет сдерживания аутоиммунной агрессии. Проанализирована эффективность лечения находившихся на долгосрочном наблюдении 48 больных РС. В ранний посттрансплантационный период через 2 мес. у большинства больных наблюдалось снижение на 0,5–1,5 балла показателей шкалы EDSS и было выявлено нивелирование нарушений функции тазовых органов, отмечался частичный регресс мозжечковой и пирамидной симптоматики. Это увеличило их физическую активность и возможность к самообслуживанию. Стабилизация неврологических функций сохранялась у 34 больных от 12 мес., в отдельных случаях до 8 лет. Возникающие обострения после ВИСТ АТ по мнению пациентов носили более мягкий, часто менее продолжительный характер. Отмечены клиничко-катамнестические данные, свидетельствующие о замедлении процесса прогрессирования заболевания. У 1 больного с миастенией была достигнута стойкая длительная клиническая ремиссия с увеличением силы мышц, регрессом бульбарных нарушений. ВИСТ АТ позволила улучшить прогноз и исход СКВ (Осина И.Г., 2007). По индексу активности болезни ECLAM полная ремиссия была достигнута у 4 из 7 больных, у 3 пациентов частичная ремиссия. Отмечался регресс суставного, кожного синдромов, у 5 больных положительная динамика со стороны почечного синдрома. У одного больного с РА была достигнута клиничко-лабораторная ремиссия со снижением индекса активности болезни DAS с 2,8 до 0,9 балла. Летальных исходов, связанных непосредственно с проведением ВИСТ АТ, не выявлено. У пациентов с ОА, которым вводилась суспензия аутогенных прогениторных клеток, отмечено статистически значимое увеличение дистанции безболевого ходьбы ($\chi^2 = 9,45$, $p < 0,05$). Кроме того, у больных этой группы и группы, где вводилась только мононуклеарная фракция клеток костного мозга, получены ангиографические данные, свидетельствующие о развитии микроциркуляторного русла и включении его в коллатеральный кровоток. Таким образом, применение технологий на основе аутогенных стволовых кроветворных клеток эффективно и безопасно как у больных с АЗ, так и при ангиосклерозе нижних конечностей, что связано с их влиянием на различные патогенетические механизмы.

С.В. Сазонов, А.П. Ястребов, С.Л. Леонтьев

Влияние трансплантированных Т-лимфоцитов на состояние регенераторных процессов в органах при старении организма

ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия

Уральская государственная медицинская академия
Минздравсоцразвития России,
Екатеринбург, Россия
Prof - SSazonov@yandex.ru

S.V. Sazonov, A.P. Yastrebov, S.L. Leontiev

Effect of transplanted T lymphocytes in the state of the regenerative processes in the organs of the aging body

Актуальность. При возрастной инволюции во всех быстро обновляющихся тканях обнаружено снижение активности пролиферативных процессов, что связано с уменьшением величины пролиферативного пула и митотической активности клеток за счет замедления их выхода в митотический цикл. В экспериментах с адоптивным переносом лимфоидных клеток выявлена способность Т-популяции живых лимфоцитов оперированных животных стимулировать процессы пролиферации в тканях одноименных органов доноров. В то же время получены данные, что в результате старения организма в нем снижается как общее число Т-лимфоцитов, так и клеток, относящихся к популяции Т-хелперов, а также значительно изменяются их свойства.

В этой связи существенный интерес представляет изучение изменений морфогенетических свойств этих лимфоцитов у животных в процессе их старения.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на крысах-самцах линии Вистар зрелого (8–10 мес., массой 200–250 г) и старого (19–22 мес., массой 400–500 г) возраста. Животные содержались в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием лабораторных животных, 1989 г.». Группы животных формировались следующим образом: контрольная группа — модель адаптивного переноса спленоцитов от зрелых животных зрелым; вторая опытная группа — модель адаптивного переноса лимфоидных клеток от старых старым животным; третья группа — трансплантация лимфоидных клеток от старых животных зрелым; четвертая группа — трансплантация лимфоидных клеток от зрелых животных старым.

Морфогенетические свойства клеток селезенки нефрэктомизированных животных из разных возрастных групп исследовались в системе адоптивного переноса. Через 19 ч после выполнения односторонней нефрэктомии (донорский интервал) крысам линии Вистар, животных забивали и из селезенки готовили взвесь клеток в среде 199. Все операции по приготовлению суспензии проводили на холоде. Полученная суспензия вводилась внутривенно реципиентам по 400×10^3 клеток на 0,2 кг массы животного. За 8 часов до забоя животные получали внутривенно однократно в дозе 2 мг/кг массы винбластин. Реципиентов забивали через 40, 48 и 56 ч после переноса спленоцитов. Почки фиксировались в формалине, на гистологических срезах производили расчет статмокинетического индекса (СКИ), значения которого выражали в %.

Результаты. При трансплантации лимфоидных клеток в контрольной группе (зрелые реципиенты и доноры). Пик подъема статмокинетического индекса приходится на 48 часов после трансплантации спленоцитов доноров реципиентам. В это время СКИ увеличивается в 26,8 раза ($p < 0,001$) по сравнению с предыдущим сроком. Через 56 часов процессы клеточного деления в почке реципиентов ослабевают, а к 72 часам уже не отличаются от уровня в почках интактных животных соответствующего возраста.

При трансплантации спленоцитов старых животных после проведения им односторонней нефрэктомии старым реципиентам, у последних, во все изученные сроки, не обнаружено достоверного изменения уровня митотической активности в эпителии почечных канальцев. Трансплантация этих же спленоцитов зрелым животным сопровождается увеличением статмокинетического индекса в их почках в 47,3 раза ($p < 0,001$) с последующим снижением его уровня к 56 ч. Однако и в этот срок уровень активности процессов клеточного деления в 4,8 раза превышает ($p < 0,001$) уровень соответствующего показателя в почках контрольной группы.

Адоптивный перенос лимфоидных клеток от зрелых животных к старым также приводит к подъему (в 7 раз; $p < 0,001$) уровня статмокинетического индекса через 48 ч после их трансплантации. Активность клеточного деления сохраняется примерно на этом же уровне и через 56 ч, что в 2,2 раза выше ($p < 0,05$) уровня статмокинетического индекса при трансплантации спленоцитов от зрелых зрелым животным, в 3,7 раза ($p < 0,01$) — при трансплантации от старых старым и в 2,2 раза ниже ($p < 0,05$) — при выполнении адоптивного переноса этих же лимфоидных клеток зрелым животным.

Таким образом, при трансплантации спленоцитов, полученных от старых доноров старым реципиентам не обнаружено стимуляции пролиферативных процессов в эпителии канальцев почек последних. Подобные изменения в системе адоптивного переноса могут происходить как за счет изменения морфогенетических свойств лимфоидных клеток, так и за счет изменения пролиферативных потенциалов клеток почечного эпителия или за счет наличия обеих причин одновременно. Перенос этих же спленоцитов зрелым донорам сопровождается проявлением их морфогенетической функции. При этом активность пролиферативных процессов в почках реципиентов оказалась выражена не меньше, чем в контрольной группе. Трансплантация спленоцитов от зрелых доноров старым реципиентам также приводит к проявлению морфогенетических свойств лимфоидных клеток. Однако уровень активности пролиферативных процессов в почках реципиентов оказался значительно ниже, чем в контрольной группе.

О. Саркисов¹, А. Шахбазян¹, А. Карменян²,
А. Кривохарченко³

**Лазерный микроманипулятор
для ранних, доимплантационных эмбрионов
млекопитающих**

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова
РАН, Москва, Россия

² Исследовательский центр биофотоники и
молекулярной визуализации, Национального
университета Янг-Минг, Тайбей, Тайвань

³ Центр молекулярной медицины им. Макс-Дельбрук,
Берлин-Бух, Германия
sarkisov@femto.chph.ras.ru

O. Sarkisov, A. Shakhbazyan, A. Karmenyan,
A. Krivokharchenko

**Laser micromanipulator for the early,
preimplantation mammalian embryos**

С целью создания универсального лазерного инструментария для биомедицинских целей мы собрали уникальную установку, которая может быть использована для различных видов микрохирургии. Главное достоинство установки заключается в том, что лазерные пучки трех лазеров сфокусированы на одном предметном столике микроскопа. Основными узлами установки являются: 1) фемтосекундный титан-сапфировый лазер Mai-Tai, непрерывный титан-сапфировый лазер, диодный лазер; 2) два пространственных оптических модулятора; 3) инвертированный микроскоп Olympus IX71; 4) блок регистрации и визуального контроля.

Пространственные модуляторы дают возможность создавать множество сфокусированных лазерных пучков, образованных фемтосекундным и непрерывным лазерами. Остро сфокусированные лазерные пучки будем называть оптическими ловушками. Каждая из оптических ловушек может перемещаться по различным индивидуальным траекториям. Фемтосекундные оптические ловушки могут осуществлять воздействие, а именно деструкцию биоматериала, перфорацию мембран, слияние клеток или использоваться в качестве скальпелей. Особенность этого воздействия заключается в том, что это воздействие может осуществляться без разогрева биологических объектов. Функция «непрерывных» оптических ловушек — удерживать, перемещать, ориентировать, растягивать и вращать различные объекты. Инфракрасный полупроводниковый лазер (1,48 мкм) используется для перфорации блестящей оболочки. Установка позволяет использовать атомно-силовую микроскопию, регистрировать флуоресцентные спектры и интегральную люминесценцию, а также осуществлять непрерывную видео регистрацию в процессе лазерных процедур. Для подбора оптимальных условий проведения микрохирургических манипуляций, в установке отработана возможность изменения различных параметров лазерного луча (мощности излучения, длительности импульса, chirpирование импульса, экспозиция облучения).

Созданная установка позволяет проводить высокопрецизионные и максимально щадящие операции на клеточном уровне, что представляет качественную замену традиционных инвазивных приемов микроманипулирования в клеточной инженерии. Реализация таких возможностей крайне интересна для работ с ранними эмбрионами млекопитающих, особенно

в целях терапевтического и репродуктивного клонирования. Все ныне используемые методы клонирования млекопитающих весьма сложны и поэтому требуют большого опыта и высокой квалификации экспериментатора, но, даже при выполнении этих условий, все равно существенно снижают жизнеспособность клеток.

В настоящей работе впервые использовали несколько лазеров для проведения всех операций, связанных с клонированием эмбрионов млекопитающих, в том числе по энуклеации клеток — реципиентов (ооцитов и зигот), перфорации их блестящей оболочки, переносу соматических клеток — доноров ядер к реципиентным цитопластам и последующему слиянию цитопластов с донорскими соматическими клетками. Для перфорации блестящей оболочки, использовали полупроводниковый лазерный модуль G145PU с длиной волны 1448 нм и средней мощностью до 400 мВт, для перемещения соматической клетки к ооциту — непрерывный лазер, для инактивации хромосомной пластинки и слияния соматической клетки с соматической клеткой — фемтосекундный лазер.

В результате проведенных исследований отработаны условия и выявлены оптимальные характеристики лазерного импульса, необходимые для последовательного осуществления всех операций по клонированию эмбрионов млекопитающих. При проведении экспериментов лазеры полностью заменили используемые в практике традиционные виды микроманипуляторов. Настоящая работа показывает уникальные возможности использования сопряжения нескольких типов лазеров для клеточной инженерии на ранних эмбрионах млекопитающих.

Сахаб Хайдар А.

**Влияние трансплантации мультипотентных
мезенхимальных стромальных клеток
из жировой ткани на площадь дефектов кожных
покровов у лабораторных животных
с инфицированными ранами**

Белорусский государственный
медицинский университет,
Минск, Республика Беларусь

Sahab Haidar A.

**Effect of transplantation of mesenchymal
stem cells from adipose tissue defects
in the area skin in laboratory animals wounds
with infections**

Цель: изучить влияние мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани на площадь дефектов кожных покровов у крыс с инфицированными ранами.

Материал и методы. Использованы взрослые белые крысы с моделированной на спине гнойной раной линии Wistar весом 160–200 г. Все животные были разделены на 2 группы: с трансплантацией культивированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) (основная группа) и (контрольная группа) без трансплантации. В сравниваемых группах с целью определения площади раневого дефекта проводилась фотосъемка цифровой камерой Canon Power Shot A630. Полученное изображение импортировалось в интерфейс программы Scion Image, где производилось измерение площади

раневого поверхности. Расчет осуществляли на 3, 5, 7, 10 и 14 сут. после лечения.

Результаты и обсуждение. При динамическом наблюдении экспериментальных ран у крыс, было выявлено, что процессы регенерации протекали по разному в контрольной в опытной группах. Начальная площадь у всех животных была около 177 мм². В контрольной группе на 3 сут. площадь раны сохранялась на уровне 177 мм². В течение последующих сроков наблюдения отмечалось следующее: на 5 — площадь раны равнялась 94 мм², на 7 — 35 мм², на 10 сут. была 37 мм², и на 14 сут. — 19 мм². При анализе показателей площадь ран в эти же сроки в основной группе было выявлено, что в контрольные сроки измерений площадей раневых дефектов составляли 118 мм², 70 мм², 93 мм², 37 мм², 9 мм² соответственно выбранным сроком выведения животных из эксперимента. При анализе полученных данных оказалось, что уменьшение площади ран в основной группе наступало раньше и быстрее, чем в контрольной.

Таким образом, на основании полученных результатов, можно сделать заключение о том, что ММСК, полученные из жировой ткани, ускоряют процесс регенерации и заживления ран, влияют на воспалительный процесс в ране и в более короткие промежутки времени восстанавливают утраченные кожные покровы.

Е.В. Семина, М.Н. Карагяур, В.Ю. Сысоева,
К.А. Рубина, Д.В. Стамбольский, Н.И. Калинина,
В.А. Ткачук

Изучение влияния генно-терапевтического препарата на основе нейротрофического фактора роста BDNF на восстановление периферической иннервации

Факультет фундаментальной медицины МГУ
им. М.В. Ломоносова, Москва
e - semina@yandex.ru

E.V. Semina, M.N. Karagyaur, V.Yu. Sysoeva,
K.A. Rubina, D.V. Stambolsky, N.I. Kalinina,
V.A. Tkachuk

Influence of brain-derived neurotrophic factors in gene therapy of peripheral innervation

Нарушения периферической иннервации, вызванные травмами, ишемией и нейродегенеративными заболеваниями являются важнейшей причиной временной и стойкой инвалидности населения России трудоспособного возраста. Для успешной стимуляции роста и восстановления нерва требуется поддержание выживаемости и регенерации нейронов, регуляция направленного роста аксонов, поэтому для ускорения процесса восстановления в месте повреждения нерва необходимо обеспечить стабильную и длительную экспрессию нейротрофинов. С этой точки зрения наиболее перспективным представляется способ стимуляции восстановления иннервации, в основе которого лежит применение плазмидных конструкций, кодирующих ключевые регуляторы роста и восстановления нервных окончаний, а именно BDNF, который обеспечивает выживание и регенерацию нейронов и стимулирует рост отростков нервных клеток. Для введения плазмидных конструкций используют множественные локальные инъекции в мышцы, что позволяет достичь

высокого уровня трансфекции мышечных волокон и стабильной экспрессии трансгена. Последовательность BDNF человека содержит редкие триплеты нуклеотидов, что может негативно влиять на эффективность его экспрессии в мышце, однако, благодаря вырожденности генетического кода, редкие триплеты могут быть заменены на те, которые встречаются в генах человека наиболее часто, без изменения аминокислотной последовательности соответствующих белков.

В нашей лаборатории кДНК BDNF человека получали с помощью прямого химического синтеза фрагментов, в соответствии с последовательностью, опубликованной в базе данных NCBI. Для оптимизации последовательности нуклеотидов, кодирующей BDNF, выявляли триплеты, наиболее редко встречающиеся в генах человека, которые заменяли на триплеты, кодирующие те же аминокислоты, но при этом встречающиеся в генах человека наиболее часто. В результате вырожденности генетического кода все аминокислоты природной кДНК BDNF оставались неизменными. Идентичность полученных последовательностей BDNF и BDNF^{opt} определяли с помощью секвенирования. В качестве контроля использовали пустой плазмидный вектор (CONT).

Продукцию секретируемого фактора BDNF в культуральной среде определяли методом ELISA. Согласно этим измерениям, продукция BDNF *in vitro* в культуральную среду клеток HEK293, трансфицированных вектором CONT, составила 13 пг белка на 10⁶ клеток; клеток HEK293, трансфицированных вектором BDNF — 243 пг/10⁶ клеток; при трансфекции клеток вектором BDNF^{opt} — 325 пг/10⁶ клеток. Для изучения восстановления нерва в переднюю большеберцовую мышцу вводили по 60 мкг плазмидного вектора CONT и BDNF^{opt}.

Повреждение общего малоберцового нерва осуществляли путём его раздавливания, что по классификации Сэддона соответствует аксонотмезису. Сразу после повреждения нерва проводили инъекцию плазмиды в количестве 60 мкг/мл с последующей низковольтной электропорацией мышцы в месте аппликации плазмиды. Параметры электропорации — 100 В/см ткани. Восстановление нервных волокон оценивали с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания криосрезов нерва специфичными антителами к зрелым аксонам на 4-е сутки после повреждения, а также по вызванному потенциалом действия, регистрируемым с дистальной части нерва на 7-е сутки после повреждения.

В результате проведённых исследований впервые показано, что инъекция оптимизированной последовательности плазмиды BDNF^{opt} способствует восстановлению периферического нерва мыши по сравнению с введением CONT плазмиды. Результатом является достоверное увеличение числа аксонов в повреждённом нерве (в 1,7 раза по данным статистического обчёта криосрезов, окрашенных антителами к маркеру зрелых аксонов); достоверное уменьшение латентного периода (в 1,4 раза) и достоверное возрастание амплитуды суммарного потенциала действия нерва (в 1,5 раза) при введении плазмиды с BDNF^{opt} по сравнению с введением плазмиды CONT.

Таким образом, полученные в ходе данной работы результаты могут быть в дальнейшем использованы в регенеративной медицине, травматологии, транс-

плантологии и нейробиологии для стимуляции роста и регенерации нервов и восстановления периферической иннервации тканей, а также для изучения механизмов участия нейротрофических факторов в регенерации периферических нервов. Предлагаемый способ позволит ускорить восстановление структуры и проводимости периферических нервов после травм за счёт локального увеличения продукции нейротрофического фактора роста в результате трансфекции мышц, иннервируемых поврежденным нервом, плазмидной конструкцией для экспрессии BDNF^{opt}.

Работа осуществлена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (Государственный контракт № 16.512.12.2005).

В.В. Соловьева, А.А. Ризванов

Повышение эффективности вирусной трансдукции с помощью рекомбинантного гистона

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
rizvanov@gmail.com

V.V. Solovyova, A.A. Rizvanov

Increased efficiency of viral transduction using recombinant histone protein

Генетическая модификация клеток репликационно дефектными вирусами *in vitro* (*ex vivo*) обеспечивает адресную доставку и экспрессию рекомбинантных генов, что позволяет контролировать вирусную инфекцию и иммунный ответ организма к вирусным векторам. Актуальной проблемой остается разработка подходов повышения эффективности вирусной трансдукции, не оказывающих токсическое действие на клетки и применимых в клинике.

Сегодня используют различные подходы для повышения эффективности вирусной трансдукции (протамин сульфат, полибрен, и др.), однако эти методы обладают рядом недостатков, препятствующих их применению в клинике.

Цель работы — исследование влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность инфицирования клеток рекомбинантными адено- и лентивирусами. Гистоны — положительно заряженные белки, которые взаимодействуют с ДНК путём электростатических взаимодействий. Важная особенность гистонных белков — их низкая токсичность в широком диапазоне исследуемых концентраций. В настоящее время компания «Фармсинтез» и Институт Стволовых Клеток Человека проводят клинические исследования по применению рекомбинантного гистона H1.3 человека (в составе препарата Онкогист) для лечения онкологических заболеваний. При этом показана безопасность внутривенного введения препарата. Мы предположили, что благодаря своему выраженному положительному заряду гистоны могут взаимодействовать с отрицательно заряженными вирусными частицами и мембранами клеток, выступая аналогами катионных реагентов, таких как протамин сульфат.

Материал и методы. Рекомбинантный гистон H1.3 был любезно предоставлен Институтом Стволовых Клеток Человека. Влияние гистона H1.3 на аденовирусную инфекцию исследовали на модели рекомбинантного репликационно дефектного

аденовируса 5 типа, экспрессирующего зелёный флуоресцентный белок GFP (Ad5-EGFP). Для получения рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP проводили субклонирование гена *egfp* из вектора pDONR221_EGFP в вектор pAd/CMV/V5-DEST по технологии GateWay® (Invitrogen), с последующей продукцией рекомбинантного аденовируса в клетках линии HEK293A. Влияние гистона H1.3 на лентивирусную инфекцию исследовали на модели рекомбинантного репликационно дефектного лентивируса, экспрессирующего зелёный флуоресцентный белок GFP (GFP-RV). Рекомбинантный лентивирус получали с помощью котрансфекции культуры клеток плазмидами, кодирующими разные компоненты рекомбинантного вируса: pWPT-GFP (векторная плазида), psPAX2 (упаковочная плазида), pCMV-VSV-G (оболочечная плазида). Полученными вирусами, Ad5-EGFP и GFP-RV, трансдуцировали клетки линии HeLa с добавлением или без добавления гистона H1.3. Анализ эффективности вирусной трансдукции определяли по экспрессии инфицированными клетками GFP с помощью проточной цитофлуориметрии.

Результаты. Добавление гистона H1.3 в культуральную среду повышало эффективность аденовирусной трансдукции клеток линии HeLa на 60% по отношению к клеткам, трансдуцированным только Ad5-EGFP без добавления H1.3. Добавление гистона H1.3 в культуральную среду повышало эффективность лентивирусной трансдукции клеток линии HeLa на 186,57% по отношению к клеткам, трансдуцированным только GFP-RV.

Выводы. Положительно заряженный гистон H1.3 повышает эффективность адено- и лентивирусной инфекции клеток *in vitro*, однако необходимы дальнейшие исследования механизмов этого процесса и влияние системного введения рекомбинантного гистона H1.3 на вирусные инфекции *in vivo*.

А.Н. Томилин

Генетическая модификация плюрипотентных стволовых клеток для безопасного использования в ткане-заместительной терапии

Институт цитологии РАН,
Санкт-Петербург, Россия
antom@mail.cytsp.rssi.ru

Плюрипотентные клетки — эмбриональные стволовые или недавно созданные клетки с индуцированной плюрипотентностью являются весьма многообещающим субстратом для тканезаместительной терапии у человека, поскольку обладают не только свойством самообновления, но и способностью к дифференцировке в разнообразные клеточные типы. Однако существенным препятствием к созданию на их основе медицинских технологий является свойство образовывать тератомы в тканях организма после трансплантации. Мы разработали подход, основанный на использовании суицидального гена, что позволяет элиминировать плюрипотентные клетки из чистой или смешанной культуры *in vitro* и после введения *in vivo*. В усовершенствованном варианте данная технология, как нам представляется, позволит в перспективе создать способы лечения рецессивных наследственных заболеваний.

A.N. Tomilin

Genetics sensitization for a safer use of pluripotent stem cells in tissue-replacement therapy

The pluripotent cells, the ES and recently discovered iPS cells, hold great promises for tissue-replacement therapy in human because they possess the capacity for unlimited self-renewal *ex vivo* and ability to differentiate into virtually any cell type of the organism. However one of the major hurdles significantly delaying the introduction of these cells in clinics is their inherent ability to form teratomas — rapidly growing tumors consisting of all three germ layer cell types. On the other hand, residual undifferentiated ES/iPS cells practically always persist even in long-term differentiating cellular populations derived thereof. Existing methods have certain limitations such as low yield and contamination risk. We have developed an alternative, suicidal gene-based approach, called genetic sensitization, allowing robust elimination of pluripotent cells from pure or mixed population both *in vitro*. Besides, such elimination is fully *in vivo*, which allows direct transplantation of undifferentiated ES/iPS cells into recipient mice without any preliminary *in vitro* manipulations, followed by the teratoma-free homing of these cells to the damaged tissue and differentiation into desired cell types. The approach might be of particular interest when *in vitro* differentiation protocols are ineffective. Thus, the developed technology may significantly increase safety, as well as to broaden the applicability of the pluripotent stem cell-based therapies. We currently bolster the genetic sensitization approach by deploying on-integrative delivery vectors, which should abolish risks of insertional mutagenesis and epigenetic silencing following integration of suicidal cassette into genome. As a long-term aim, we wish to combine tissue-replacement, genetic sensitization, and gene therapy technologies for treatment of recessive hereditary diseases.

Ю.В. Храмова¹, С.А. Сергеев¹, И.В. Ильина²,
Д.С. Ситников², А.В. Овчинников², М.Л. Семенова¹,
М.Б. Агранат²

Новый бесконтактный метод для направленного выделения субпопуляций клеток эмбриона на стадии бластоцисты

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Объединенный Институт Высоких Температур РАН, Москва, Россия
yul.khramova@gmail.com

Y.V. Khramova, S.A. Sergeev, I.V. Ilina, D.S. Sitnikov,
A.V. Ovchinnikov, M.L. Semenova, M.B. Agranat

The New Contactless Method for the Directed Isolation of Subpopulations of Embryonic Cells at the Blastocyst Stage

Биопсия клеток эмбриона является важным этапом для последующего проведения генетической диагностики. В настоящее время наиболее популярным и наиболее широко применяемым методом биопсии является механический метод. Однако среди его недостатков можно выделить то, что он требует затраты определенного времени на подготовку микроинструментов, также необходимо, чтобы опе-

ратор микроманипулятора был высоко квалифицирован, кроме того, существует риск контаминации эмбрионов.

Мы разрабатываем новую технологию бесконтактного манипулирования с эмбрионами млекопитающих. В частности, наша технология направлена на усовершенствование процедуры биопсии клеток трофэктодермы. Лазерная установка с функциями оптического скальпеля и оптического пинцета была разработана в Объединенном институте высоких температур РАН в Отделе лазерной плазмы под руководством М.Б. Аграната. В ходе проведенных исследований мы использовали фемтосекундную лазерную установку с активной средой хром-форстерит, генерирующую импульсы длительностью 100 фс на длине волны 1240 нм с частотой повторения 80 МГц и средней мощностью 200 мВт (CrF-65P, ООО «Авеста проект»), а также наносекундную лазерную установку фирмы Carl Zeiss.

Эксперименты проводили на эмбрионах мышей линии C57Bl/6J на стадии бластоцисты. Лазерными импульсами проводили направленное выделение клеток трофэктодермы бластоцисты, приступившей к хэтчингу. Затем выделенные клетки захватывали в оптическую ловушку и отводили в сторону от эмбриона. В исследованиях было задействовано 37 эмбрионов. Эффективность процедуры составила 62,2%. Все бластоцисты, у которых успешно отделили участок трофэктодермы, на следующие сутки проходили хэтчинг. Эмбрионы культивировали в условиях инкубатора (среда для культивирования M16 (Millipore) 37°C, 5% CO₂, 98% влажности). При окрашивании флуоресцентными красителями Hoechst и Propidium iodide было обнаружено положительное окрашивание ядер клеток эмбрионов Hoechst и отрицательное окрашивание Propidium iodide. Таким образом, эмбрионы были жизнеспособны после проведенной процедуры.

Разрабатываемая нами технология обладает рядом преимуществ по сравнению с технологиями, которые применяют в настоящее время для проведения процедуры биопсии. Во-первых, она позволяет выделять определенную субпопуляцию клеток эмбриона на стадии бластоцисты — клетки трофэктодермы. Во-вторых, сокращается время для подготовки процедуры, так как нет необходимости настраивать микроинструменты. В-третьих, она снижает риск контаминации эмбрионов, благодаря уменьшению количества микроинструментов, необходимых для проведения манипуляций. Также немаловажным качеством нашей технологии является то, что она облегчает работу оператора.

Е.Е. Черенкова¹, В.Ю. Федотова¹, Р.Р. Исламов²,
А.А. Ризванов¹

Создание экспрессионных векторов, кодирующих репортерные белки, молекулы клеточной адгезии, проангиогенные, нейротрофические и нейропротекторные факторы для генной и генно-клеточной терапии

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия
Rizvanov@gmail.com

E.E. Cherenkova, V.Yu. Fedotova, R.R. Islamov,
A.A. Rizvanov

Generation of expression vectors encoding reporter proteins, cell adhesion molecules, pro-angiogenic, neurotrophic and neuroprotective growth factors for gene and gene-cell therapy

Одной из ключевых задач генной терапии является создание экспрессионных генетических конструкций, обеспечивающих перенос рекомбинантных генов в целевые клетки *ex vivo* (*in vitro*) или *in vivo*. Рекомбинантные гены могут кодировать различные белки: репортерные — для визуализации процессов генетической модификации клеток и для отслеживания миграции, выживаемости и дифференцировки генетически модифицированных клеток *in vivo*; терапевтические — различные ферменты, факторы роста и молекулы адгезии, повышающие жизнеспособность клеток, модулирующие тропизм и способность к дифференцировке в определенном направлении. В качестве векторов доставки применяют различные вирусные и невирусные генетические конструкции. Наиболее биобезопасными генетическими векторами считают плазмиды — двухцепочечные кольцевые молекулы ДНК, обладающие малой иммуногенностью и не способные к интеграции в геном клетки-мишени, что определяет их онкологическую безопасность. Однако, несмотря на перечисленные достоинства, плазмидным векторам присущ ряд недостатков, таких как низкая эффективность трансфекции клеток и кратковременная экспрессия трансгенов. Альтернативой плазмидным векторам служат вирусные конструкции. Вирусы представляют собой естественную биологическую систему переноса генов в клетки. Векторы на основе аденовирусов эффективно переносят гены как в делящиеся, так и в покоящиеся клетки, не встраиваются в геном, обеспечивают высокие титры рекомбинантного вируса при продукции и высокий уровень экспрессии трансгенов *in vivo* и *in vitro*. К недостаткам аденовирусных векторов относят высокую иммуногенность. В разработке методов генной терапии также применяют векторы на основе лентивирусов. Эти вирусы способны инфицировать различные типы клеток и интегрироваться в геном клеток, тем самым обеспечивая долговременную экспрессию и передачу трансгена при клеточном делении. В то же время интеграция в геном может приводить к вставочному мутагенезу и риску онкологических осложнений. Таким образом, при разработке генной и генно-клеточных технологий необходимо тщатель-

но подходить к выбору как терапевтических генов, так и генетических векторов для их оптимальной доставки.

В настоящее время одной из перспективных систем для создания генетических конструкций является система рекомбинации на основе ферментов бактериофага лямбда — GateWay (Invitrogen). Система позволяет с высокой точностью и эффективностью переносить фрагменты ДНК между различными генетическими векторами с помощью сайт-специфичной рекомбинации. Более того, группой американских ученых (Yang et al., 2011) на основе технологии GateWay создана коллекция клонов (hORFeome V8.1), кодирующих более 16100 открытых рамок считывания генов человека, для эффективного субклонирования в различные экспрессионные векторы.

Целью работы является создание генетических конструкций на основе экспрессионных плазмидных, аденовирусных и лентивирусных векторов, кодирующих: синий (BFP), зеленый (EGFP) и красный (HcRed) флуоресцентные белки; различные изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF121, VEGF165, VEGF189); основной фактор роста фибробластов (FGF2), глиальный нейротрофический фактор (GDNF); молекулу адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM₁); нейральную молекулу адгезии (NCAM₁). В качестве доноров использовали GateWay плазмиды, кодирующие кДНК рекомбинантных генов, полученные в результате ТОРО-клонирования продуктов ПЦР-амплификации в плазмиду pENTR, или полученные из некоммерческих банков плазмид (AddGene или DF/HCC DNA Resource Core, Harvard Medical School, США). В качестве векторов назначения использовали плазмиду pCMV-Sport6 (Invitrogen), лентивирусные конструкции pLX₃₀₁ и pLX₃₀₃ (Miller et al., 1993), аденовирусную конструкцию pAd/CMV/V5-Dest (Invitrogen). Получение целевых генетических конструкций подтвердили рестрикционным анализом и секвенированием. Рекомбинантные вирусы получали трансфекцией аденовирусных конструкций pAd в клетки HEK293A или ко-трансфекцией плазмид pLX, упаковочной плазмиды psPAX2 и оболочечной плазмиды pCMV-VSV-G в клетки HEK293T. Экспрессию рекомбинантных белков подтвердили флуоресцентными и иммунологическими методами.

Таким образом, получены рекомбинантные плазмидные, аденовирусные и лентивирусные конструкции, экспрессирующие молекулы клеточной адгезии (NCAM₁, VCAM₁), репортерные белки (BFP, EGFP, HcRed), про-ангиогенные, нейротрофические и нейропротекторные факторы (VEGF121, VEGF165, VEGF189, FGF2, GDNF). Планируется создание GateWay-совместимого экспрессионного вектора на основе адено-ассоциированного вируса AAV Helper System (Stratagene, Канада) для последующего субклонирования вышеописанных генов. В дальнейшем полученные генетические конструкции будут использованы в экспериментах *in vivo* и *in vitro* для разработки методов генной и генно-клеточной терапии различных дегенеративных заболеваний человека.

Н.Н. Чуб, В.В. Киروشка, Ю.О. Тищенко,
Е.Б. Ревенко, М.П. Петрушко, В.И. Пиняев

**Образование фолликулоподобных структур
путем имплантации клеток гранулезы
и кумулюса яичника человека**

*Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины,
Харьков, Украина*

N.N. Tchoob, V.V. Kiroshka, Ju.O. Tischenko,
E.B. Revenko, M.P. Petrushko, V.I. Pinajev

**Formation of follicular-like structures
by implantation of cumulus-granulosa cells
of human ovarian**

До настоящего времени, несмотря на многолетние исследования, остается актуальной проблема восстановления гормональной и генеративной функции яичников млекопитающих и человека. Для этой цели используют как фармакологические и гормональные препараты, так и трансплантацию яичников или фрагментов овариальной ткани. Клетки гранулезы и кумулюса (КГК) яичника человека являются основными стероидопродуцирующими структурами, однако, до развития метода оплодотворения *in vitro* (IVF) они были малодоступны.

Целью данного исследования было экспериментальная разработка метода имплантации и оценка состояния графтов клеток гранулезы и кумулюса до и после криоконсервирования.

Материал и методы. В работе было использовано 13 самок крыс линии Вистар массой 150–200 г. Имплантацию нативных и криоконсервированных фрагментов КГК размером 4–6 мм² (4–5 шт) осуществляли под капсулу левой почки по стандартной методике одновременно с овариэктомией (о/э). Операции животным проводили в стерильных условиях под кетамин-ксилазиновым наркозом. На 10–12 сутки после имплантации производили извлечение КГК вместе с почкой. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и эозином. КГК получали при проведении программы IVF. Фрагменты КГК отмывали от клеток крови и ФЖ, помещали в охлажденную среду Хэнкса и хранили при 0–4°C до имплантации животным или криоконсервирования. Замораживание образцов КГК проводили по 3-х этапной программе после 15–20 мин экспозиции в криозащитной смеси (5% ДМСО + 5% ПЭО-400).

Результаты. В ходе проведенных экспериментальных исследований отмечено, что послеоперационный период у крыс протекал без видимых осложнений, не было картины отторжения имплантатов и вторичной инфекции. При визуальном осмотре животных, в контрольной и в экспериментальных группах, через 24 часа наблюдали формирование раневой поверхности, которая представляла собой часть неизменной кожи в виде плотного неподвижного рубца. К 10 сут. эксперимента у крыс гиперемия в области шва практически исчезла. Краевая область ран была представлена, в основном, фибробластоподобными клетками, многочисленными лимфоцитами и нейтрофилами, наличие которых свидетельствует об остаточной воспалительной реакции эпидермального эпителия в области имплантации. На 12 сут. имело место полное заживление поврежденных участков кожи.

При гистологическом исследовании ткань почки сохраняла характерную для нее архитектуру, не отмечено изменений тинкториальных свойств клеток, однако была обнаружена некоторая дистрофия графта в криоконсервированных образцах, характеризующаяся пикнозом ядер в клетках КГК. В районе подсадки наблюдали выраженное полнокровие, дилатацию сосудов и капилляров. В ксенотрансплантатах КГК, хранившихся при гипотермии, сохранялась характерная для этих клеток зернистость цитоплазмы, связанная с секреторной функцией клеток. Клетки имели овальную или полигональную форму с большим эксцентрично расположенным ядром. Новообразованные эпителиоподобные элементы, отходя от поверхности имплантата, состояли из довольно мелких клеток, в которых изредка наблюдались митозы. Однако в некоторых КГК наблюдали пористость цитоплазмы, признак дегенеративных изменений в клетках. Характерной особенностью макромолекулярной архитектуры имплантатов КГК, хранившихся при гипотермии, является образование фолликулоподобных структур, напоминающих структуру развивающегося фолликула в интактном яичнике. В криоконсервированных имплантатах КГК также были обнаружены оптически однородные фолликулоподобные образования, однако с более плотным расположением клеток, чем у ксеноимплантатов, хранившихся при гипотермии. По своей структуре фолликулоподобные образования напоминали структуру антрального фолликула. По-видимому, данные структурные перестройки инициируются эндогенными факторами (животным не удаляли гипоталамо-гипофизарный комплекс). На месте подсадки криоконсервированных КГК наблюдали васкуляризацию и скопление пролиферирующих фибробластов. Клетки ксенотрансплантата плотно прилегали к клеткам почки и прорастали в орган. Отмечена умеренная инфильтрация, как стенок сосудов, так и окружающих слоев ткани. Однако, чтобы оценить переживаемость и функциональные характеристики имплантатов необходим более длительный срок после подсадки, что является целью наших дальнейших исследований.

Выводы. 1) Данные исследования показали возможность использования для трансплантации криоконсервированных фрагментов КГК, которые сохраняли свою репаративную активность.

2) После гипотермического хранения и криоконсервирования ксеноимплантаты КГК не только сохраняли структуру, но, вероятно, за счет межклеточных контактов происходило формирование структур, напоминающих фолликулы.

Н.К. Шахпазян¹, Т.А. Астрелина¹, М.В. Яковлева¹,
А.Е. Гомзяков¹, Н.А. Новоселова¹, Я.А. Круглова¹,
Е.В. Боякова¹, Б.Л. Лазебник², О.В. Князев²,
Е.В. Скоробогатова³

**Сравнение биологических свойств
мультипотентных мезенхимальных
стромальных клеток костного мозга
и плаценты для клинического применения**

¹ ГБУЗ «Банк стволовых клеток Департамента
Здравоохранения города Москвы»,
Москва, Россия

² ЦНИИ гастроэнтерологии, Москва, Россия

³ Российская детская клиническая больница
Минздравсоцразвития РФ, Москва, Россия

N.K. Shakhpazyan, T.A. Astrelina, M.V. Yakovleva,
A.E. Gomzyakov, N.A. Novoselova, Y.A. Kruglova,
E.V. Boyakova, B.L. Lazebnik, O.V. Knyazev,
E.V. Skorobogatova

**Comparison of the biological features
of human bone marrow and placenta-derived
mesenchymal stem cells for clinical use**

В последние годы все больше появляется сообщений о клиническом применении мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (мезенхимальных стволовых клеток, МСК) в качестве иммуномодулирующей терапии при таких заболеваниях и патологических состояниях как рассеянный склероз, первичный билиарный цирроз, реакция трансплантат против хозяина (РТПХ) и др. Применение МСК с целью иммуномодулирующей терапии не требует подбора доноров по принципу антигенной совместимости с реципиентом и позволяет использовать МСК аллогенных доноров. В качестве «первого» источника получения МСК был использован костный мозг, в настоящее время доказано, что МСК могут быть выделены из различных органов и тканей. Перспективным источником культивирования МСК является плацента, которая имеет ряд существенных преимуществ.

Цель исследования: сравнить биологические характеристики заготовленных МСК костного мозга и плаценты для применения в клинической практике.

Материал и методы. Было проведено сравнение МСК, заготовленных из 99 образцов костного мозга здоровых доноров (56 мужчин, 43 женщины, средний возраст 28,5 лет) и 43 образцов плаценты, полученных после срочных родов (средний срок гестации 39,6 недель), здоровых женщин (средний возраст — 28,6) лет. Выделение МСК костного мозга (МСК-КМ) для получения первичной культуры проводилось на градиенте плотности фикола 1,077 г/мл; выделение МСК плаценты (МСК-Пл) проводилось после измельчения и обработки ее 0,1% раствором коллагеназы. Культивирование МСК проводилось по стандартной методике. На ранних пассажах (2–6 пассаж) определяли поверхностные клеточные маркеры: CD3, CD13, CD14, CD19, CD25, CD29, CD31, CD34, CD38, CD44, CD45, CD69, CD73, CD90, CD105, CD106, CD133, CD166, HLA-DR методом проточной цитофлуориметрии. Рассчитывали пролиферативный индекс (кратность прироста) МСК на каждом пассаже до 10 пассажа. Плотность посадки МСК в культуральном флаконе составляла 4500 — 5700 кл./см². Проводилось бактериологическое и вирусологическое исследование МСК.

Результаты и их краткое обсуждение. Проведенное исследование показало, что МСК-Пл по сравнению с МСК-КМ обладают достоверно более высоким пролиферативным индексом на протяжении 10 пассажей ($5,82 \pm 3,09$ и $3,51 \pm 2,17$, соответственно, $p < 0,001$). Кроме того, в МСК-КМ было отмечено снижение пролиферативного индекса к поздним пассажам ($4,3 \pm 2,52$ на 1–3 пассаже, $2,26 \pm 1,4$ на 9–10 пассаже, $p < 0,001$), а для МСК-Пл пролиферативный индекс к поздним пассажам достоверно не изменялся ($5,92 \pm 3,45$ на 1–3 пассаже; $4,82 \pm 2,77$ на 9–10 пассаже, $p = 0,127$).

Заготовка доз МСК для клинического применения проводилась на 2–6 пассаже (медиана — 4 пассаж) для МСК-КМ, на 2–6 пассаже (медиана — 4,5 пассаж) для МСК-Пл. Более высокая медиана пассажей МСК-Пл по сравнению с МСК-КМ объясняется тем, что было заготовлено для клинического применения большее количество МСК-Пл (в среднем $318,46 \times 10^6$ на образец) по сравнению с МСК-КМ (в среднем $120,14 \times 10^6$ на образец).

При анализе экспрессии поверхностных маркеров МСК отмечался уровень экспрессии, характерный для клеток мезенхимального происхождения и достоверных различий для МСК-КМ и МСК-Пл выявлено не было. Уровень экспрессии поверхностных маркеров МСК-КМ был следующий: CD29 — $94,4 \pm 4,7\%$, CD90 — $99 \pm 2,1\%$, CD166 — $52,4 \pm 29,2\%$, CD73 — $80,1 \pm 14,1\%$, CD105 — $80 \pm 5,7\%$, CD44 — $95,2 \pm 3,5\%$, CD13 — $98,2 \pm 1,5$. Уровень экспрессии поверхностных маркеров МСК-Пл был: CD29 — $89,9 \pm 10,7\%$, CD90 — $84,7 \pm 12,6\%$, CD166 — $48,3 \pm 22,8\%$, CD73 — $66,6 \pm 17,2\%$, CD44 — $85,6 \pm 14,4\%$, CD13 — $86,6 \pm 11\%$. В МСК-КМ и МСК-Пл не было экспрессии маркеров: CD45, CD14, CD69, CD31, CD34, CD133, HLA-DR, CD3, CD19, CD25, CD38, CD106.

Достоверных различий уровня экспрессии поверхностных маркеров с 3 по 6 пассаж в МСК-КМ и МСК-Пл также не выявлено.

На 4–5 пассаже и 9–10 пассаже проводилось карiotипирование (20–30 метафаз в каждой культуре). Не было выявлено потенциально опасных для пациентов генетических отклонений в МСК-КМ и МСК-Пл.

МСК-КМ были использованы в качестве иммуномодулирующей, улучшающей приживление гемопоэтических стволовых клеток терапии и терапии РТПХ у 28 пациентов (7 — с острыми миелобластными лейкозами; 7 — с апластической анемией; 3 пациента с иммунодефицитом; 3 — с лимфогистиоцитозом; 2 — с хроническим миелолейкозом; 5 — с миелодиспластическим синдромом; 1 — с остеопетрозом).

МСК-Пл были применены в качестве иммуномодулирующей терапии при лечении 8 пациентов (1 — с хроническим панкреатитом, 5 — с циррозом печени, 2 — с миелодиспластическим синдромом, 1 — с апластической анемией и 1 — с нейтропенией).

Острых реакций (респираторный дистресс-синдром, фебрильные, аллергические реакции и др.) на трансфузию МСК-КМ и МСК-Пл не отмечалось.

Выводы. МСК костного мозга и плаценты обладают сходным иммунофенотипом, характерным для клеток мезенхимального происхождения, начиная уже со второго пассажа.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что применение МСК-Пл в клинической практике, с точки зрения технологии культивирования «ex vivo», имеет следующие преимущества:

— отсутствие какого-либо инвазивного вмешательства в процесс родов;

— наличие высокого пролиферативного индекса на протяжении не менее 10 пассажей, что является важным для получения достаточной дозы для клинического применения уже на втором пассаже культивирования.

Финансирование исследования осуществлялось Департаментом здравоохранения города Москвы.

Е.А. Шуман, А.В. Коротков, О.Г. Макеев

Изучение эффективности генно-клеточной терапии ишемии сердца в модельном эксперименте

¹ Уральская государственная медицинская академия» МЗ и СР РФ, Екатеринбург, Россия

² ГБУЗ СО «Институт медицинских клеточных технологий», Екатеринбург, Россия
larim@mail.ru

E.A. Shuman, A.V. Korotkov, O.G. Makeev

The study of the effectiveness of gene-cell therapy in ischemic heart in a model experiment

Возможность генно-клеточной терапии заболеваний сердца находится в центре внимания многих исследователей. Было показано, что применение генетически модифицированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), сверхэкспрессирующих гены факторов ангиогенеза, в частности VEGF, сопровождается не только новообразованием сосудов, но и улучшением функций сердца в целом. Однако в данных исследованиях использовались векторы на основе вирусов, интегрирующихся в геном, что потенциально может привести к мало предсказуемым последствиям, существенно ограничивающим их применение в клинической практике. Между тем, сведений об оценке эффективности применения ММСК, предварительно трансфицированных векторами, обеспечивающими эпигеномную экспрессию генов ангиогенеза, в доступной литературе найти не удалось.

Это позволило сформулировать **цель** настоящей работы: оценить эффективность применения ММСК, трансфицированных невирусными векторами гена VEGF.

Материал и методы. В исследовании был использован вектор pWZLblast-VEGF, любезно предоставленный доктором Bruce Spiegelman (Dana Farber Cancer Institute, США).

ММСК выделяли из жировой ткани кролика. Полученные клетки трансфицировали pWZLblast-VEGF или плазмидой, несущей ген флюоресцирующего протеина EGFP (Addgene plasmid 13031), с использованием Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) по оптимизированному протоколу.

Эксперименты проводили на взрослых кроликах-самцах породы Шиншилла весом 2,8–3,2 кг. Моделирование окклюзии передней нисходящей артерии сердца проводили путем ее неполной (80%) перевязки на мандрене. Сразу после перевязки в миокард в область ишемии равномерно по площади вводили 10^6 клеток, предварительно трансфицированных pWZLblast-VEGF или EGFP. Экспериментальной группе животных ($n = 5$) вводили клетки, трансфицированные pWZLblast-VEGF, контрольной ($n = 5$) — EGFP, соответственно.

Спустя 30 сут. после вмешательства проводили исследования парциального давления кислорода в миокарде методом полярографии, с последующим иссечением участков миокарда и определением числа капилляров, диаметра, обменной поверхности и емкости капиллярного русла в расчете на 1 мм³ ткани.

Результаты. В опытной группе животных к исходу 30 сут. отмечено значимое увеличение количества капилляров в ишемизированной зоне и наличие анастомозов с сосудистым руслом неповрежденных участков. При этом средний диаметр капилляров по сравнению с неповрежденными участками, изменялся незначительно (на 7,2%, $p > 0,1$).

В то же время в группе контрольных животных визуализируемая плотность капиллярного русла в зоне ишемии была достоверно ниже, чем в соседних неповрежденных областях миокарда.

Кроме того, в контрольной группе, в отличие от опытной, не наблюдалось прорастания капиллярной сети из неповрежденных областей миокарда в ишемизированную зону.

В опытной группе, по сравнению с контрольной, в зоне моделируемой ишемии было выявлено большее количество функционирующих капилляров (на 224,2%, $p < 0,05$), их плотности на единицу объема (на 350,1% $p < 0,01$) площади их поверхности (на 245,4%, $p < 0,01$) и pO_2 (на 282% $p < 0,01$).

Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность применения предварительно генетически модифицированных ММСК для восстановления кровоснабжения миокарда. В отличие от известных исследований, в качестве вектора использована плаزمиды, не встраивающаяся в геном, что, по-видимому, может определять перспективность ее использования в клинической практике.

Л.Д. Якунина, Р.А. Курбанов, О.В. Бондарь, Т.И. Абдуллин

Сравнительное исследование поведения периферических нейронов, глиальных клеток и клеток PC12 на модифицированных поверхностях

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия
tabdulli@gmail.com

L. Yakunina, R. Kurbanov, O. Bondar, T. Abdullin

Comparative study of activity of peripheral neurons, glial cells and PC12 cells on modified surfaces

Одной из важных задач тканевой инженерии и регенеративной медицины является создание моделей культур клеток для исследования активности (био-) материалов и лекарственных средств. Актуальным остается вопрос об информативности подобных моделей для оценки регенерации нервных тканей.

Мы исследовали поведение клеток крысы (феохромоцитомы PC12 и выделенных из спинномозговых ганглиев клеток) в различных условиях. Оптимизирована методика получения кокультуры ганглионарных нейронов и глиальных клеток, имеющих морфологические признаки Шванновских клеток и позитивных по белку S-100. Клетки культивировали на полистироловых чашках, модифицированных полиорнитинном, фибронектином и ламинином в бессывороточной среде Neurobasal с добавлением фактора роста нервов.

Выяснено, что поверхность с полиорнитином способствует адгезии всех типов клеток, не наблюдаемой на исходном полистироле. Поверхность, последовательно модифицированная полиорнитином и ламинином, наряду с первичной адгезией, обеспечивает быстрый рост нейритов первичных нейронов и распластывание клеток РС12, по-видимому, вследствие взаимодействия мембранных рецепторов с ламинином. Возникающие при этом морфологические изменения клеток РС12 выражены значительно слабее, чем у первичных нейронов. В условиях опыта, фибронектин не обладает активностью ламинина и слабо поддерживает рост нервных клеток.

Способность модифицированной поверхности стимулировать образование нейритов коррелирует с пролиферацией Шванновских клеток. Последние сохраняют способность к пролиферации на полиорнитиновой поверхности в отсутствие ламинина. Пролиферация Шванновских клеток в культуре с нейронами способствует появлению нейритов, по-видимому, за счет секреции клетками белков внеклеточного матрикса.

Полученные результаты служат методологической основой *in vitro* тестирования (био-)материалов для регенерации периферических нервов.

А.П. Ястребов, Д.Ю. Гребнев, С.В. Сазонов,
С.Л. Леонтьев, И.Ю. Маклакова

Изменение основных морфометрических показателей селезенки на фоне трансплантации стволовых клеток в условиях острой кровопотери

ГБОУ ВПО Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России,
Екатеринбург, Россия
ГБУЗСО Институт медицинских клеточных технологий, Екатеринбург, Россия
IMCT@yandex.ru

A.P. Yastrebov, D.U. Grebnev, S.V. Sazonov,
S.L. Leontyev, I.U. Maklakova

Changing the main morphometric parameters of spleen against the stem cells transplantation in acute blood loss

Известно, что селезенка, как орган периферической иммунной системы, играет важную роль в процессах адаптации организма к воздействию экстремальных факторов. В ранее проведенных нами исследованиях был выявлен эффект активации регенерации быстро обновляющихся тканей после воздействия экстремальных факторов на фоне сочетанной трансплантации мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Настоящее исследование по анализу основных морфометрических показателей селезенки в условиях острой кровопотери проведено с целью расшифровки механизма повышения регенерации тканей на фоне трансплантации стволовых клеток.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 36 белых лабораторных мышках-самцах возраста 3–4 мес., массой 25–30 г. Эксперименты по получению культуры ММСК и ГСК (из пуповинной крови и плаценты) выполнены на 12 лабораторных животных мышках-самках возраста 3–4 мес., срок гестации — 18 дней. Животные были разделены на 2 группы: животные с острой кровопотерей и животные в физиологических условиях. Массивную кровопотерю

вызывали кровопусканием из хвостовой вены мыши в объеме 2% от массы тела, что составляет 25–35% от объема циркулирующей крови. В каждой группе были выделены опытная и контрольная подгруппы: опытная подгруппа — внутривенное (в/в) введение ММСК в дозе 6 млн кл./кг и ГСК в дозе 300 тыс. кл./кг в 0,2 мл физ. раствора; животным контрольной подгруппы в/в вводилось 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl. Внутривенные введения осуществлялись через 1 час после кровопускания однократно. Для изучения обзорной гистологической картины и морфометрического анализа во всех сериях экспериментов для исследования производилась аутопсия селезенки. Для каждого ряда значений показателя вычисляли среднее арифметическое, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий оценивали с помощью *t* — критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты. В физиологических условиях на 5 сут. после сочетанной трансплантации ММСК и ГСК при проведении морфометрического исследования селезенки лабораторных мышей установлено, что изучаемые показатели существенно не отличались от данных, полученных в группе контроля.

На 5 сут. после острой кровопотери на фоне сочетанной трансплантации ММСК и ГСК установлено уменьшение средней площади лимфоидного фолликула по сравнению с контрольной подгруппой. Тем не менее, площадь лимфоидного фолликула после введения стволовых клеток была больше, чем в норме. Выявлено уменьшение площади В-зоны лимфоидного фолликула относительно контрольной подгруппы ($0,08 \pm 0,008 \times 10^5$ мкм², $p < 0,05$), в то же время отмечено отсутствие эффекта от введения клеток площади тимусзависимой зоны селезенки. При анализе расстояния между центрами фолликулов выявлено увеличение данного показателя по сравнению с контрольной подгруппой ($461,71 \pm 12,90$ мкм, $p < 0,05$). На 5 сутки после введения стволовых клеток на фоне острой кровопотери обнаружено также увеличение общей клеточности красной пульпы на 16,1% относительно контрольной подгруппы. Выявлено увеличение содержания эритроцитов и лейкоцитов в единице объема красной пульпы на 14,1% и 18,0% соответственно по сравнению с контрольной подгруппой.

Таким образом, эффект от сочетанной трансплантации ММСК и ГСК на морфометрические показатели селезенки обнаруживается в условиях острой кровопотери и отсутствует в физиологических условиях. Этот эффект выражается в уменьшении площади лимфоидного фолликула за счет уменьшения площади В-зоны селезенки. Данный эффект можно объяснить иммуносупрессивными характеристиками ММСК, которые заключаются в выработке ряда факторов (iNO синтетаза, ЦОГ-2, TGFβ), снижающих способность Т и В лимфоцитов к пролиферации. Тем не менее, площадь лимфоидного фолликула была больше, чем у лабораторных животных в контроле (без острой кровопотери), что может быть обусловлено миграцией лимфоцитов из крови в селезенку и заселение ими соответствующих зон. Также выявлено увеличение общей клеточности красной пульпы после трансплантации стволовых клеток, что может быть обусловлено процессами дифференцировки трансплантированных клеток, а также собственными КОЕс, мигрирующими из костного мозга.